

**Biochemisch-taxonomische Untersuchungen
zur Untergliederung
der Art *L.acidophilus***

Christine Helming

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Biochemisch-taxonomische Untersuchungen zur
Untergliederung der Art L.acidophilus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig Maximilians Universität
München

vorgelegt
von
Christine Helming
aus
Lörrach

München 1976



1. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler
2. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Fiedler

Tag der Einreichung der Arbeit: 17.3.1976

Tag der mündlichen Prüfung: 3.6.1976

Für Gerhard

I. <u>Einleitung</u>	1
1. Historischer Überblick über Entdeckung und Klassifizierung von <i>L.acidophilus</i>	1
2. Neuere biochemische Merkmale	2
2.1 Zellwandzusammensetzung	2
2.2 Lactatdehydrogenasen	12
2.3 G+C-Basengehalt der DNS	12
2.4 DNS-Homologie	13
3. Zielsetzung	13
II. <u>Material und Methoden</u>	15
1. Organismen	15
2. Nährmedien	17
2.1 MRS-Medium	17
2.2 Grundmedium zur Bestimmung des Zuckerspektrums	17
3. Stammhaltung	17
4. Messung des Wachstums	18
5. Zellernte	18
6. Gewinnung und Hydrolysebedingungen der Zellwände	18
6.1 Gewinnung	18
6.2 Hydrolysebedingungen	18
7. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Zellwände	19
7.1 Papierchromatographische Auftrennung der Aminosäuren und Aminosucker	19
7.2 Quantitative Analyse der Aminosäuren und Aminosucker mit dem Aminosäureanalysator	19
7.3 Papierchromatographische Auftrennung der Zellwandzucker	19
7.4 Gaschromatographische Bestimmung der Zellwandzucker	20

7.4.1	Aufarbeiten der Proben	20
7.4.2	Temperaturprogramme	20
7.4.3	Auswertung der Läufe	20
7.5	Papierchromatographischer Nachweis von Ribit- und Glycerin-Teichonsäuren	21
7.6	Quantitative Bestimmung des Phosphatgehaltes der Zellwände	21
7.6.1	Reagenzien	21
7.6.2	Eichkurve	23
7.6.3	Probenvorbereitung	23
7.6.4	Testansatz	23
7.6.5	Berechnung	23
8.	Teichonsäureextraktion mit Trichloressigsäure	24
9.	Dinitrophenylierung von Zellwänden	24
9.1	Ansatz	24
9.2	Bestimmung	25
10.	Glucosevergärung im Puffer	25
11.	Aufschluß der Zellen und Herstellung des Rohextraktes für die enzymatischen Untersuchungen	25
12.	Test zur Bestimmung der D- und L-LDH im Rohextrakt	26
12.1	Standardtest für die Reaktion der D- und L-LDH in unphysiologischer Richtung mit D- und L-Lactat als Substrat	26
12.2	Standardtest für die Reaktion der D- und L-LDH in physiologischer Richtung mit Pyruvat als Substrat	26
13.	Optischer Milchsäuretest	27
14.	Proteinbestimmung	27
15.	Disc-Elektrophorese	27
15.1	Entwicklung der Gele	28
15.2	Berechnung	29
16.	Isolierung der DNS und G+C-Bestimmung	29
16.1	Isolierung der DNS	29

16.2	Bestimmung des G+C-Gehaltes	30
16.2.1	Prinzip	30
16.2.2	Messung des Schmelzpunktes	31
16.2.3	Berechnung des T_m	31
17.	DNS-Hybridisierung	33
17.1	DNS-Isolierung	33
17.2	Zerlegung der DNS in Einzelstränge	34
17.3	Beladen der Membranfilter mit den DNS-Einzelsträngen	34
17.4	Messung der DNS-Menge	35
17.4.1	Prinzip	35
17.4.2	Reagenzien	35
17.4.3	Durchführung des Testes	36
17.4.4	Eichkurve	36
17.5	Präparation der markierten DNS	36
17.6	Vorinkubation der beladenen Filter mit Denhardt-Reagenz	36
17.6.1	Prinzip	36
17.6.2	Reagenz	37
17.6.3	Ansatz	37
17.7	Fragmentierung der markierten DNS	37
17.8	Denaturierung der markierten DNS	37
17.9	Hybridisierungsansatz	37
17.10	Berechnung der % Homologie	38
III. <u>Ergebnisse</u>		39
A. <u>Klassische Merkmale</u>		39
1.	Racematbildung bei <i>L.acidophilus</i>	39
1.1	Isomerenverhältnis	39
1.1.1	Abhängigkeit von der Wachstumsphase	39
1.1.1.1	Unterschied im Isomerenverhältnis in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase bei verschiedenen Stämmen	39

1.1.1.2	Kinetik bei <i>L.acidophilus</i> AM 63 Gasser	42
1.1.1.3	Kinetik bei <i>L.acidophilus</i> DSM 20242	44
1.1.1.4	Kinetik bei <i>L.acidophilus</i> DSM 20077	44
1.1.1.5	Kinetik bei <i>L.acidophilus</i> DSM 20079	44
1.1.2	Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Zellen	48
1.1.2.1	<i>L.acidophilus</i> DSM 20242	48
1.1.2.2	<i>L.acidophilus</i> AM 63 Gasser	50
1.1.3	Wirkung von L-Lactat auf das Isomerenverhältnis während des Wachstums von DSM 20242	50
1.2	Vergleich der spezifischen Aktivitäten der D- und L-Lactatdehydrogenasen während des Wachstums	51
1.2.1	<i>L.acidophilus</i> AM 63 Gasser	52
1.2.2	<i>L.acidophilus</i> DSM 20242	53
1.3	Mn- und FDP-Aktivierbarkeit der D- und L-Lactatdehydrogenasen bei <i>L.acidophilus</i> DSM 20242	53
1.4	Diskussion der Ergebnisse zur Frage des Isomerenverhältnisses	54
2.	Wachstumstemperatur	55
3.	Zuckerverwertungsspektren	56
<u>B. Neuere biochemische Merkmale</u>		63
1.	Elektrophoretische Beweglichkeit der Lactatdehydrogenasen	63
1.1	Vergleich der NAD-abhängigen D- und L-Lactatdehydrogenasen	63
1.2	NAD-unabhängige D- und L-LDH	65
2.	Zellwandzusammensetzung	66
2.1	Murein	66
2.2	Zellwandzucker	70
2.3	Zellwandteichonsäuren	70
3.	G+C-Basengehalt der DNS	72
4.	DNS-Homologie	74
4.1	Methodische Vorversuche	74

4.1.1.	DNS-Isolierung	74
4.1.2.	Bindung der nicht-markierten DNS am Membranfilter	75
4.1.2.1.	Einfluß der Filterporengröße	75
4.1.2.2.	Einfluß der Salzkonzentration	75
4.1.3.	Markierung von DNS mit ^3H -Thymidin und ^3H -Adenin	76
4.1.4.	Hybridisierung	76
4.1.4.1.	Bindungsspezifität	78
4.1.4.2.	Hybridisierungstemperatur	78
4.1.4.3.	Hybridisierungszeit	80
4.2.	DNS-Homologie bei <i>L.acidophilus</i>	82
IV.	<u>Schlußbetrachtung</u>	86
V.	<u>Zusammenfassung</u>	90
VI.	<u>Literaturverzeichnis</u>	93

Abkürzungen

L.	Lactobacillus
LDH	Lactatdehydrogenase
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
Lys	Lysin
dE	Extinktionsänderung
FDP	Fruktose-1,6-di-Phosphat
Glu	Glutaminsäure
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (internationale Enzymeinheit) = 1 μ M/min
DNase	Desoxyribonuclease
RNase	Ribonuclease
m	molar
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe (1960)
G	Guanin
C	Cytosin
TCA	Trichloressigsäure
DNP	2,4,-Dinitrophenyl
ZW	Zellwand
SSC	Salinecitrat (0,15 m NaCl, 0,015 m Trinatrium- citrat pH 7)
Saline-EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (0,15 m NaCl, 0,1 m EDTA pH 8)

I. Einleitung

1. Historischer Überblick über Entdeckung und Klassifizierung von L.acidophilus.

Systematische Untersuchungen der Darmflora des Menschen begannen Ende des vorigen Jahrhunderts. Metschnikoff war ein Vorläufer auf diesem Gebiet, dem Escherich (1885), Tissier (1900) und Moro (1905) folgten. Die Forschungsergebnisse dieser Autoren, die auch noch heute zum Teil Gültigkeit haben, bildeten die Basis für die heutigen Untersuchungen der Darmflora.

Beinahe gleichzeitig mit der Entdeckung des Bacterium bifidum beschrieb Moro 1900 einige kleine regelmäßige Milchsäurestäbchen, die sich aus den Faeces durch Anreicherung in sauren Substraten isolieren ließen, weshalb er sie Bacillus acidophilus nannte. Man hatte diesen Organismus zwar schon vorher im Säuglingsstuhl bemerkt, es war aber nie gelungen ihn zu isolieren. Moro beschrieb diesen Organismus folgendermaßen: "Er ist ein 1,5-2 μ langes, 0,6-0,9 μ breites, meist langgestrecktes, an den Enden etwas zugespitztes Stäbchen. Die optimale Wachstumstemperatur für den Organismus ist die Körpertemperatur, während bei 20-22° C niemals Wachstum bemerkt wurde. Der Bacillus bildet kein Gas und ist ein ziemlich energischer Säurebildner. Was das Sauerstoffbedürfnis anbetrifft, so ist hervorzuheben, daß er zwar auf sämtlichen Nährböden bei Sauerstoffausschluß besser gedeiht, aber nicht als obligat anaerob zu bezeichnen ist."

Seit dieser Beschreibung von Moro (1900) wurden viele Versuche unternommen, diese Keime näher zu bestimmen, die Häufigkeit und Regelmäßigkeit ihres Vorkommen im Säuglings- und Erwachsenenendarm zu ermitteln und den Grund ihres Vorhandenseins im menschlichen Darm zu erkennen. Dabei stellte sich heraus, daß die isolierbaren grampositiven Stäbchen

nicht als eine Art anzusprechen sind, sondern eine Gruppe verschiedener Species darstellen. Es kam durch verschiedene Veröffentlichungen zu Unklarheiten und Widersprüchen, da man sich nicht immer um eine genügende Differenzierung der isolierten Stäbchen bemühte.

Seit Metschnikoff (1908) ist die Diskussion über günstige Wirkungen von Joghurt und anderen Sauermilchen auf die Darmflora immer aktuell gewesen und auch kommerziell ausgenutzt worden. Metschnikoff nahm an, daß es sich bei den grampositiven Stäbchen im Darm um den gleichen *Lactobacillus* handelt wie bei dem im bulgarischen Joghurt vorkommenden grampositiven Stäbchen, das heute allgemein als *L.bulgaricus* bezeichnet wird. Er glaubte, daß die Zufuhr dieses tatsächlich als "physiologisches" Darmbakterium angesehenen Keimes für die sprichwörtliche Langlebigkeit der Bulgaren verantwortlich sei und nannte ihn daher auch den *Bacillus* des langen Lebens.

In den folgenden Jahren (ab 1914) beschäftigte sich Rettger in erster Linie mit der Frage der Bedeutung acidophiler Bakterien im Darm. In zahlreichen Untersuchungen an Menschen und Tieren konnte er zeigen, daß die Ernährung mit Milch bei gleichzeitiger Darreichung von Lactose für die Anreicherung der *Lactobacillen* des *Acidophilus*- und *Bifidus*-Typ im Darm von allergrößtem Wert ist. Ein weiteres Verdienst Rettgers und seiner Mitarbeiter bestand darin, daß sie die Resultate, die die *Acidophilus*-Forschung bis dahin ergeben hatte, einer exakten Nachprüfung unterzogen und somit etwas Ordnung in die meist widersprüchlichen Ergebnisse brachten. Ihre *Acidophilus*-Stämme hatten im Großen und Ganzen dieselben Eigenschaften wie sie Moro schon beschrieben hatte. Sie versuchten auch die Beziehung der verschiedenen *Lactobacillen*arten zueinander sowie deren Unterscheidungsmerkmale aufzuklären. Diese Untersuchungen dienten auch zur Überprüfung der Metschnikoffschen Thesen über die Einpflanzungsmöglichkeiten von *L.bulgaricus* im Darm. Sie betrachteten dabei *L.bulgaricus* und *L.acidophilus* als einer Art zugehörig,

mit *L.acidophilus* als "zentralem Typ". *L.bulgaricus* sollte somit eine Variante von *L.acidophilus* sein, der im Gegensatz zu *L.acidophilus* seine Fähigkeit im Darm leben zu können verloren hat.

Ebenso erzielte Fischer (1919) beim Verzehr von *Acidophilus*-Milchkulturen gute Erfolge in der medizinischen Anwendung. Sowohl Lerche und Reuter (1962) als auch Mitsuoka (1969) berichten, daß die im Darminhalt aerob wachsenden *Lactobacillen* bei einer qualitativen Bestimmung sich nicht nur als *L.acidophilus*, sondern als eine ganze Gruppe von *Lactobacillen* erwiesen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht, die sich eingehender mit diesem Problem beschäftigt haben (Orla-Jensen 1919, Herneberg 1934).

Zudem sind noch Arbeiten zu erwähnen, in denen über anderweitiges Vorkommen von *Bacillus acidophilus* berichtet wurde. Verschiedene Autoren wie Kantorowicz (1911), Howe et al. (1917), Schlirf (1926) und andere haben bei ihren Untersuchungen an kariösen Zähnen festgestellt, daß hierbei regelmäßig anzutreffende Stäbchen mit dem *Bacillus acidophilus* Moro übereinstimmten.

Die zahlreichen medizinisch ausgerichteten Arbeiten hat Kopeloff (1926) in einer guten Übersicht zusammengefaßt. Neben seiner Gesamtübersicht über die *Acidophilus*-Forschung sind darin auch die Ergebnisse der von Kopeloff selbst angestellten Experimente enthalten, die nochmals den therapeutischen Wert der *Acidophilus*-Milch bestätigen.

In den folgenden Jahren beschäftigte man sich dann vorwiegend mit der Beschreibung dieser Art und ihren Unterscheidungsmerkmalen zu anderen Arten.

1914 hatte Rahe eine Klassifizierung von *L.acidophilus* und *L.bulgaricus* auf Grund ihrer unterschiedlichen Zuckerverwertung vorgeschlagen. Nach seinen Arbeiten (1914) ist

Bacillus acidophilus in der Lage Maltose, Saccharose und Lävulose zu vergären, während *L.bulgaricus* diese Fähigkeit nicht besaß. Seine Angaben sind später von mehreren Autoren bestätigt worden, so von Kulp und Rettger (1924), Kopeloff (1926), Henneberg (1926) und anderen. Im Gegensatz dazu standen Veröffentlichungen von Cruishank und Berryl (1924), die diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten. Sie fanden bei 52 untersuchten *L.acidophilus* Stämmen 44, die Maltose nicht abbauen konnten.

Nach Schlirf (1926) wies *Acidobacterium bulgaricum* gegenüber *Acidobacterium Moroi* ein höheres Säuerungsvermögen auf. Außerdem wurden unterschiedliche Kolonieförmigkeiten beobachtet. Henneberg (1926) betrachtete schließlich den Volutingehalt des *Bacillus acidophilus* als ein besonders typisches Merkmal. Im übrigen bestätigte er die Angaben von Rettger über den therapeutischen Wert von *Acidophilus*-Milch und sah ebenso wie Rahe (1914) das unterschiedliche Kohlehydratfermentierungsvermögen als Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen der *Acidophilus*- und *Bulgaricus*-Gruppe an.

1928 bezeichnete Druckrey folgende Eigenschaften als typisch für *L.acidophilus*: Abbau von Maltose, Saccharose und Lävulose, wie es auch schon von Kulp und Rettger (1924) beschrieben worden war, geringe Säurebildung bei bevorzugter Bildung von L-Milchsäure, sowie die Fähigkeit, sich im menschlichen Darm anzusiedeln. Ebenso wie Kulp und Rettger hielt er *L.bulgaricus* für eine Abart von *L.acidophilus*, der die Fähigkeit im menschlichen Darm zu wachsen verloren hat und der auch nicht imstande war, die oben erwähnten Zucker zu spalten, was Weaver (1932) wiederum abstritt und beide Formen für Maltose- und Saccharose-positiv hielt. Druckrey (1928) beobachtete, daß *L.acidophilus* durch Züchtung in Milch das Maltose-Vergärungsvermögen einbüßen konnte und es gelang ihm auch, dem *L.bulgaricus* diese Fähigkeit anzuzüchten. Er konnte also wie später Weaver (1932) kein exaktes Unterscheidungsmerkmal für die beiden Typen angeben.

1933 untersuchten Curran et al. 103 Stämme und teilten sie nach ihrer Säurebildung, der Wachstumstemperatur, der Kolonieform, der Vergärung von bestimmten Kohlehydraten und der Hemmung durch Phenol und Indol in 3 Gruppen ein. Für eine dieser Gruppen fand er 56 Stämme, bei denen sich eine Korrelation zwischen der Bildung fransiger und rauher Kolonien, einer Wachstumstemperatur zwischen 20°C und 46°C, der Verwertung von Raffinose und dem fehlenden Abbau von Mannit zeigte. Diese Gruppe, die in der Regel mehr CO₂ und einen größeren Prozentsatz an flüchtigen Säuren bildete und auch bei höheren Konzentrationen von Phenol und Indol wachsen konnte als die Vertreter der beiden anderen Gruppen, wurde von ihm als *L.acidophilus* bezeichnet. Sie zeichneten sich auch vor allen Dingen durch die Produktion von DL-Milchsäure aus. Die Vertreter dieser Gruppe waren auch im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen nicht von Zähnen isoliert, sondern aus dem Intestinaltrakt von Menschen.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Curran fanden auch Rogosa et al. (1953) Stämme von *L.acidophilus* in der Mundflora. Sie teilten ihre Isolate in 4 Typen ein, wobei sich nur die Vertreter der 1. Gruppe durch das von Curran schon beschriebene Zuckerverwertungsspektrum auszeichneten, während sich die Gruppe 2 (2 % aller untersuchten Stämme) nur durch schwache bzw. langsame Melibiosevergärung, die Gruppe 3 (4 %) durch Sorbitvergärung und die Gruppe 4 durch langsame Raffinosevergärung unterschieden. Sie fanden auch, daß *L.acidophilus* nie Mannit vergären konnte, wie es auch schon von Orla-Jensen 1936, Curran 1932, Harrison et al. 1950 und Tittsler et al. 1947 gefunden wurde.

Untersuchungen zum unterschiedlichen Verhalten von *L.acidophilus* und *L.bulgaricus* gegenüber Kohlehydraten wurden auch von Weather (1955) durchgeführt, die Unterschiede in der Vergärung von Raffinose, Trehalose und Melibiose fand. Zusätzlich fand Davis 1955 noch unterschiedliche Salicinverwertung.

Ebenso wie die Untersuchungen von Weather (1955) haben einfache biochemische Tests in Arbeiten von Briggs (1953) und Rogosa et al. (1953) gezeigt, daß es eine klare Trennung zwischen *L.bulgaricus* und *L.acidophilus* gibt, da *L.acidophilus* im Gegensatz zu *L.bulgaricus* Mannit Melizitose, Sorbit, Rhamnose, Raffinose und Salicin verwerten kann.

1954 fand Baumgärtel bei Untersuchungen an *L.acidophilus* eine große Variabilität in der Zuckerverwertung verschiedener Stämme und teilte sie folgendermaßen ein :

Typ	Gluc	Mal	Lac	Sacch	Raff
A	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	-
C	+	+	-	+	-
D	+	+	-	-	-

Einen weiteren Versuch Klarheit in diese zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der letzten 60 Jahre zu bringen, unternahmen Lerche und Reuter (1962). Sie teilten ebenso wie Rogosa et al. (1953) ihre Isolate aus den Faeces in 4 Typen ein, wobei der gegen Sauerstoff empfindlichste Typ I sowohl im Darm als auch in der Mundflora zu finden war. Typ II trat bedeutend weniger häufig auf und Typ III und IV kamen nur sehr vereinzelt vor. In der Verwertung bestimmter Zucker unterschieden sie sich folgendermaßen:

Typ	Treh	Meli	Raff
I	+	-	-
II	+	-	+
III	+	+	+
IV	-	-	+

1969 isolierte Mitsuoka aus Menschenstuhlproben 230 Lactobacillen, wobei er 56 *L.acidophilus* Stämme fand. Alle Vertreter von *L.acidophilus* waren mit Ausnahme seines Typs X Citrat, Malat und Ribose negativ. Alle anderen Zucker wie Glucose, Mannose, Fructose, Galactose, Saccharose, Maltose, Cellobiose und Salicin wurden in der Regel von diesen Stämmen verwertet. Auf Grund ihres Vorkommens und ihrer unterschiedlichen Zuckerverwertung (Tabelle) teilte er seine Stämme in 10 Biotypen ein, wobei die Typen III und V nach ihrem Verhalten gegenüber Mannit, die Typen IV und VI nach ihrem Verhalten gegenüber Stärke in je zwei Subtypen (a und b) eingeteilt wurden.

Typ	Lac	Treh	Meli	Raff	Meliz	Mannit	Sorb
I	+	+	-	-	-	+	-
II	+	+	+	+	-	-	-
IIIa	+	+	+	+	-	-	-
IIIb	+	+	+	+	-	+	+
IVa	+	-	+	+	-	-	-
IVb	+	-	+	+	-	-	-
Va	+	-	-	-	-	-	-
Vb	+	-	-	-	-	+	+
VIa	+	-	+	+	-	-	-
VIb	+	-	+	+	-	-	-
VII	-	+	+	+	+	-	-
VIII	-	+	+	+	-	-	-
IX	-	-	-	-	-	-	-
X	+	+	+	+	+	+	+

Zur Abgrenzung von *L.acidophilus* zu *L.salivarius* stimmte er den Ergebnissen von Lerche und Reuter (1962) und Rogosa und Sharpe (1959) zu, nach denen *L.salivarius* immer Mannit positiv und Cellobiose negativ sein sollte. *L.acidophilus*

zeigte genau das umgekehrte Verhalten. Allerdings fand Mitsuoka (1969) auch vereinzelt Mannit positive Vertreter von *L.acidophilus*.

Die Abtrennung von *L.acidophilus* von den übrigen Thermo-bakterien, insbesondere *L.bulgaricus* und *L.helveticus*, auf Grund deren geringeren Zuckervergärungsvermögens wurde in der Arbeit von Mitsuoka ebenfalls bestätigt, ebenso die einwandfreie Abgrenzung von *L.casei* auf Grund der Kolonieform und der Zuckerverwertungsreihe, wobei *L.casei* immer Sorbit, Ribose, Mannit, Malat und Citrat verwerten konnte.

Für die Unterscheidung von *L.acidophilus* und *L.lactis* geben Lerche und Reuter (1962) die Vergärung von Mannit, Cellobiose und Aesculin an, wobei *L.lactis* immer Mannit positiv und für die beiden anderen Zucker negativ war.

Neben diesen zahlreichen Versuchen, die Art *L.acidophilus* auf Grund ihres unterschiedlichen Kohlehydratabbaus zu unterteilen, ergaben Untersuchungen von Abo-Elnaga und Kandler (1965) für *L.acidophilus* hinsichtlich seines Vitaminbedürfnisses eine größere Zahl von Merkmalskombinationen. Die Häufung der Stämme auf wenige bevorzugte Kombinationen, wie dies bei der Zuckervergärung nach den beiden Autoren der Fall war, ergab sich allerdings dabei nicht.

In vielen taxonomischen Arbeiten zur Klassifizierung der Lactobacillen wurde die Konfiguration der gebildeten Milchsäure als ein nützliches Merkmal herangezogen (Orla-Jensen 1919, Curran 1932, Sharpe 1962, Kitahara et al. 1955). Einige Autoren wie Kopelloff (1932) und Pederson (1947) fanden bei ihren Untersuchungen keine konstanten Ergebnisse und bezweifelten den Wert dieses Merkmals. Pederson (1947) fand bei Stämmen, die von Curran (1932) auf Grund ihrer Racematbildung als *L.acidophilus* bezeichnet wurden, kein

Racemat mehr, sondern nur noch L-Milchsäure. Er nahm deshalb an, daß die Form der gebildeten Milchsäure innerhalb der Art verschieden sei und bei seinen Stämmen von der Kolonieform abhing.

Dagegen konnten Fiedler und Kandler (1964) an *L.acidophilus* Stämmen die Konstanz der Milchsäurebildung nachweisen. Sie erhielten trotz jahrelangem Wachstum in verschiedenen Medien immer Racemat.

1967 fand Garvie, daß bei einigen Stämmen von *L.acidophilus* das Verhältnis von D- zu L-Milchsäure während des Wachstums nicht konstant blieb und vom Alter der Kultur abhing. Ihre Stämme bildeten erst einen Überschuß an L-Milchsäure, der während des Wachstums durch einen Anstieg an D-Milchsäure aufgehoben wurde.

L.acidophilus ist nach Bergey (1974) folglich dadurch charakterisiert, daß er vielerlei Zucker vergären kann, DL-Milchsäure bildet, nicht bei 10°C wächst und aus Faeces, Mund oder Schleimhaut von Kindern und Erwachsenen wie aus dem Intestinal- und Mundtrakt von Truthähnen, Hühnern, Ratten und Hamstern isoliert werden kann.

Die Frage nach der therapeutischen Bedeutung von *L.acidophilus*-Präparaten bei Menschen wurde von Kandler (1969) erneut kritisch diskutiert und als wenig überzeugend belegt angesehen. Neuere Untersuchungen von Reuter (1962) und Weiß (1967) hatten nämlich gezeigt, daß nicht nur viele Varianten von *L.acidophilus* existieren, sondern daß auch andere mikroaerophile Lactobacillen im Darm vorkommen. *L.acidophilus* konnte nach Reuter nur bei etwa 30 % der untersuchten Personen im Darm nachgewiesen werden, wobei er nur höchstens 1 % der Darmflora ausmacht, die hauptsächlich von Vertretern der Gattung *Bacteroides* und *Bifidobakterium* dominiert wird. Kandler weist besonders daraufhin, daß alle bisherigen angeblich positiv verlaufenden Implantationsversuche daran

kranken, daß nicht hinreichend geprüft wurde, ob die nach der Behandlung im Darm vorkommenden Stämme von *L.acidophilus* mit den zugeführten tatsächlich identisch sind. Für eine genauere Prüfung sowohl der Implantationsversuche, als auch der Frage nach der Existenz einer spezifischen und konstanten *Acidophilus*-Flora fehlen zur Zeit noch hinreichende Kenntnisse über die Feingliederung der offenbar sehr vielfältigen Art *L.acidophilus*.

2. Neuere biochemische Merkmale

2.1 Zellwandzusammensetzung

Die Zellwandzusammensetzung wurde schon von Cummins (1955) als eine mögliche Erweiterung der Morphologie auf biochemischer Ebene angesehen, und er bezeichnete diese Art der Untersuchung als "chemische Anatomie". In seinen Untersuchungen fand er, daß im allgemeinen jede Bakteriengattung eine charakteristische Zellwandzusammensetzung besitzt. Die Zellwand von *Lactobacillen* besteht, wie bei allen grampositiven Organismen, aus 3 typischen Zellwandkomponenten: Peptidoglycan, Polysaccharide und Teichonsäuren.

Kandler (1967) und Schleifer und Kandler (1972) weisen auf die Aminosäurezusammensetzung des Peptidoglycans als ein wichtiges taxonomisches Merkmal hin. Das Peptidoglycan der Vertreter der Untergattung *Thermobakterium* ist vollkommen einheitlich und weist nach Kandler (1967) immer den Lys-Asp-Typ auf. Genauere Untersuchungen an der Zellwand von *L.acidophilus* AM63 wurden von Coyette und Ghuysen (1970) durchgeführt. Sie beschreiben bei diesem Stamm einen Molanteil von Alanin von über 2, während bei den meisten *Lactobacillen* der Wert bei 1,8 liegt. Es bleiben also bei diesem Stamm Penta-peptiduntereinheiten erhalten, während bei den übrigen *Lactobacillen* nicht nur das terminale Alanin in Position 5 der nicht quervernetzten Untereinheiten abgespalten wird,

sondern auch ein Teil des D-Alanins in Position 4, so daß Quotienten von unter 2 zustande kommen. *L. acidophilus* AM63 unterscheidet sich demnach von den anderen dadurch, daß er keine Carboxypeptidase aufweist.

Hinsichtlich der Polysaccharidzusammensetzung wurde bei den Untersuchungen der Zellwände mehrerer Stämme von *L. acidophilus* in der Regel 3 verschiedene Zucker gefunden. Davon war Glucose regelmäßig, Galactose häufiger und Rhamnose seltener vertreten.

Nach Archibald (1968) haben sicherlich alle grampositiven Bakterien eine Glycerin-Teichonsäure als intrazelluläre Komponente, die mit der Cytoplasmamembran verbunden ist und zwischen Membran und Zellwand lokalisiert ist. Teichonsäuren sind aber auch Hauptkomponenten der Zellwand vieler grampositiven Bakterien und es wurden eine Reihe von verschiedenen Typen in verschiedenen Organismen gefunden. Beide, die Zellwand- wie auch die Membranteichonsäure, sind serologisch aktiv und wurden als gruppen- und typenspezifische Antigene erkannt. Baddiley und Sharpe (1964) wiesen bei vielen *Lactobacillen* zellwandgebundene Teichonsäuren nach und konnten zeigen, daß diese Teichonsäure das gruppenspezifische Antigen einer Art darstellt. In diesen Arbeiten wurde jedoch nie *L. acidophilus* erwähnt. Versuche von Sharpe (1955) zur Klassifizierung mit Hilfe der Serologie hatten bei Vertretern der Art *L. acidophilus* keinen Erfolg, da gegen diese Art keine gruppenspezifische Antiseren gefunden werden konnten. Auch Plapp (unveröffentlicht) konnte bei der Überprüfung von *L. acidophilus* aus der Gruppe I von Reuter keine Teichonsäuren nachweisen. Ikawa et al. (1960) jedoch fanden bei ihren Untersuchungen an *L. acidophilus* Stämmen Glycerin und einen relativ hohen Phosphatgehalt, so daß sie glaubten, daß diese Art Teichonsäure vom Glycerintyp aufweist. Weiß berichtet (1967) von Untersuchungen auf

Teichonsäure an 38 *L.acidophilus*-Stämmen, wobei er nur bei 6 Stämmen eindeutig Teichonsäure vom Glycerintyp nachweisen konnte.

2.2 Lactatdehydrogenasen

Gasser (1970) wählte zur systematischen Untersuchung bei *Lactobacillen* die LDH, da die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat eine Reaktion ist, die von allen Vertretern dieser Gattung durchgeführt wird und eine wesentliche Rolle in ihrem Energiehaushalt spielt. Die Vielfalt der LDH innerhalb der Gattung *Lactobacillus* machte die Untersuchung dieser Enzyme zu einem guten taxonomischen Merkmal. Für fast alle Arten mit Ausnahme von *L.acidophilus* fand er eine gute Übereinstimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDH verschiedener Stämme. Bei 24 untersuchten Stämmen von *L.acidophilus* fand er dagegen jeweils 3 verschiedene NAD-abhängige L- und D-Lactatdehydrogenasen, die als Grundlage einer Einteilung der Art dienen können.

2.3 G+C-Basengehalt der DNS

Die Basenzusammensetzung ausgedrückt im Anteil von Guanin und Cytosin der DNS eines Organismus ist ein in den letzten Jahren zur taxonomischen Bestimmung eines Stammes wichtig gewordenes Merkmal. Während der Basengehalt der DNS der Pflanzen und Tiere keinen sehr großen Schwankungen unterliegt und mit einem Wert von 38 ± 10 % GC recht einheitlich ist, findet man bei Bakterien eine viel größere Variabilität. Der G+C-Gehalt variiert im Bereich der Bakterien von 22-78 %. Nach De Ley (1963) haben Stämme der gleichen Art immer den gleichen oder zumindest weitgehend den gleichen G+C-Gehalt. Dies gilt auch für Arten einer Gattung, sowie morphologisch und biochemisch sehr ähnliche Gattungen. Gut getrennte Gattungen sollten dagegen sehr unterschiedliche G+C-Gehalte aufweisen. Bei der Gattung *Lactobacillus* fanden Gasser und Mandel (1968) Werte von 30-53 %, was nach De Ley kaum für Verwandtschaft spricht.

Stämme von *L.acidophilus* wiesen Werte von 34,2-36,7 % auf.

2.4 DNS-Homologie

DNS-Hybridisierungstechniken sind schon mehr als 10 Jahre bekannt. Sie wurden zuerst mehr von den Genetikern und Molekularbiologen verwendet, dann aber auch mehr und mehr für die Bestimmung der Verwandtschaft von Bakterien angewandt. Die Techniken, mit denen die Ähnlichkeit der Nucleotidfolge in den Nucleinsäuren gemessen werden, stammen vorwiegend aus den Arbeiten von Doty et al. (1960) und Marmur et al. (1960). Einige neuere Arbeiten von Miller et al. (1970), Dellaglio et al. (1975) und (1973) beschäftigen sich mit der DNS-Homologie zwischen einigen Arten der Gattung *Lactobacillus*. Miller verwendete dabei auch zwei *L.acidophilus* Stämme, die Homologien von 7,4 und 100 % zu *L.leichmanii* zeigten, wobei sich der homologe Stamm allerdings als falsch klassifizierter Stamm herausstellte.

3. Zielsetzung

Die zahlreichen Versuche mit zum Teil widersprüchlichen und verwirrenden Ergebnissen über die Abgrenzung der Art *L.acidophilus* von anderen Thermobakterien haben gezeigt, daß es sich offenbar um eine sehr plastische Art handelt, also um die Zusammenfassung zahlreicher Stämme mit sehr unterschiedlichen Merkmalskombinationen und vielen, auch verschiedenen Entwicklungsrichtungen. Es scheint durchaus die Möglichkeit zu bestehen, daß heterogene Gruppen vereinigt wurden, die bei Auffindung geeigneter Merkmale als infraspezifische Taxa abgrenzbar sind oder vielleicht als eigene Arten ausgegliedert werden müssen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Einbeziehung neuerer biochemischer

und molekularbiologischer Merkmale in die Untersuchung eines größeren und von verschiedenen Arbeitskreisen isolierten Stamm-Materials, die Verwandtschaftsverhältnisse besser zu erkennen und damit die Art klarer untergliedern zu können.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Stammbezeichnung	Fundort	Herkunft
I-36-1	Faeces Säuglinge	Mitsuoka
PN-RI-2-4	Faeces Schwein	Mitsuoka
CHN-I-2-7	Faeces Huhn	Mitsuoka
A 201-7	Faeces Erwachsene	Mitsuoka
A 244-1	Faeces Erwachsene	Mitsuoka
PN-RI-2-3	Faeces Schwein	Mitsuoka
34-26	Faeces Huhn	Mitsuoka
I-69-7	Faeces Säuglinge	Mitsuoka
PN-I-9	Faeces Schwein	Mitsuoka
Kd-16-3	Faeces Kind	Mitsuoka
CHN-1-4	Faeces Huhn	Mitsuoka
T-50	Faeces Huhn	Mitsuoka
CHN-4-2-5	Faeces Huhn	Mitsuoka
T-91	Faeces Huhn	Mitsuoka
CHN-22-1-10	Faeces Huhn	Mitsuoka
CHN-j-1-6	Faeces Huhn	Mitsuoka
A 263-19	Faeces Erwachsene	Mitsuoka
F 164	Faeces Erwachsene	Reuter
VII JS	Jejunum Erwachsene	Reuter
XXV JR	Jejunum Erwachsene	Reuter
F 177a	Faeces Erwachsene	Reuter
F 169a	Faeces Erwachsene	Reuter
H 18b	Höherer Darmabschnitt Jugendl.	Reuter
Omiflor	Pharm.Präparat	Reuter
Sp 34	Sputum Erwachsene	Reuter
H 27a	Höherer Darmabschnitt	Reuter
XXIX J	Jejunum Erwachsene	Reuter
B 39/4b	Sauermilcherzeugnis,	Reuter
R I	Faeces Erwachsene	Reuter

Stammbezeichnung	Fundort	Herkunft
ATCC 314		ATCC
538	Faeces Erwachsene	Reuter
Sc	Faeces Erwachsene	Reuter
DSM 20077	Faeces Mensch	DSM
DSM 20079	Mundhöhle Mensch	DSM
D 3	Acidophilus Sauermilch	Kandler
D 4	Acidophilus Sauermilch	Kandler
69 K		Sharpe
SA 24		Sharpe
SA 12		Sharpe
SA 13		Sharpe
SA 9		Sharpe
SA 16		Sharpe
DSM 20242	Vaginaler Trakt	Sharpe
DSM 20243		Gasser

Abkürzungen:

Mitsuoka	= Dr. Tomotari Mitsuoka Institut of Physical and Chemical Research. Wako-Shi, Saitama, Japan.
Reuter	= Prof.Dr.G.Reuter, Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin.
ATCC	= American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.
DSM	= Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen.
Kandler	= Prof.Dr.O.Kandler, Institut für Botanik der Universität München.
Sharpe	= Dr.M.Elisabeth Sharpe, National Institut for Research In Dairying, Shinfield, Reading, England.
Gasser	= Dr.F.Gasser, Institut Pasteur, Paris.

2. Nährmedien

2.1 MRS-Medium (De Man et al. 1960)

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Fleischextrakt (Merck)	2 g
Hefeextrakt (Merck)	4 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
K_2HPO_4	2 g
Na-Acetat 3 H ₂ O	5 g
Di-Ammoniumcitrat	2 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	200 mg
$MnSO_4 \times H_2O$	50 mg
H ₂ O dest.	1 l
pH = 6,5	

20 Minuten bei 120°C autoklavieren.

Bei festem Nährboden wurde dem Medium noch 15 g Agar pro Liter zugegeben.

2.2 Grundmedium zur Bestimmung des Zuckerspektrums (Sharpe 1962)

MRS-Medium ohne Glucose und Fleischextrakt wurde mit 0,004 % Chlorphenolrot als Indikator versetzt und nach Einstellen des pH auf 6,5 autoklaviert.

Die verschiedenen Zucker wurden als sterile Lösungen zugegeben (Endkonzentration 0,5 %) und anschließend 15 Minuten im strömenden Dampf nochmals erhitzt.

3. Stammhaltung

Die Stämme wurden als Agarstiche bei 4°C aufbewahrt und alle 4 Wochen überimpft.

Bei der Reaktivierung von gefriergetrockneten Kulturen wurden diese mit Hilfe von Verdünnungsausstrichen auf Reinheit überprüft und ebenfalls in Stichen aufbewahrt.

4. Messung des Wachstums

Das Wachstum der Stämme wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm im Eppendorf Photometer gemessen. Als Leerprobe diente der Überstand des abzentrifugierten Mediums. Dieser Wert wurde jeweils von der Extinktion der Probe abgezogen.

5. Zellernte

Die Zellen wurden 20 Minuten durch Zentrifugieren bei 10 000 g in Kühlzentrifugen geerntet und nach 2-maligem Waschen mit Leitungswasser bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

6. Gewinnung der Zellwände und Hydrolysebedingungen

6.1 Gewinnung

Die Zellwände wurden nach der Methode von Schleifer und Kandler (1967a) gewonnen.

Die Zellen wurden in einem Homogenisator (Bühler) mit Glasperlen (0,25-0,30 mm) zerschlagen und die Zellfragmente mit einer Schott-G1 Fritte von den Glasperlen getrennt und anschließend bei 10 000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag (= Zellwände) wurde in 0,05 mol Phosphatpuffer pH 8 mit Trypsin (Merck 0,5 mg/ml) und 1-2 ml Toluol bei 37°C 18 Stunden inkubiert.

Die tryptisch verdauten Zellwände wurden dann 4 mal mit H₂O dest. gewaschen und im Lyophilisator 2 Tage getrocknet.

6.2 Hydrolysebedingungen

Zur Bestimmung des Gehaltes an Aminosäuren und Aminosucker in den Zellwänden wurden diese für die Bestimmung im Aminosäureanalysator einer Totalhydrolyse unterzogen (18 Stunden, 120°C, 6N HCl im Einschlußrohr).

Für die quantitative papierchromatographische Bestimmung wurde eine Partialhydrolyse angesetzt (1 Stunde, 100°C, 4 N HCl).

Für die papierchromatographischen Untersuchungen der Zellwandzucker wurden die Zellwände in 2 n HCl bei 100°C 3 Stunden hydrolysiert.

Nach Beendigung der Hydrolyse wurden die Röhrchen aufgebrochen und die Salzsäure mit Hilfe eines Luftstromes unter leichtem Erwärmen der Proben abgeblasen.

7. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Zellwände

7.1. Papierchromatographische Auftrennung der Aminosäuren und Aminosucker

Zur Trennung der Aminosucker und Aminosäuren wurde das Chromatographiepapier Schleicher und Schüll 2043b verwendet und die Proben darauf zweidimensional getrennt. Als Laufmittel wurden verwendet:

I. Isopropanol/Wasser/Eisessig 75/10/15 (v/v/v)

II. α -Picolin/Wasser/Ammoniak 70/28/2 (v/v/v)

In beiden Laufmitteln wurden die Chromatogramme in der oben angegebenen Reihenfolge je zweimal 16 Stunden aufgetrennt. Entwickelt wurden sie dann mit Hilfe des Ninhydrin-Sprühareagenz.

7.2 Quantitative Analyse der Aminosäuren und Aminosucker mit Aminosäurenanalysator

Die Zellwandzusammensetzung wurde zusätzlich noch quantitativ mit Hilfe des Aminosäurenanalysators (Beckman) bestimmt.

7.3 Papierchromatographische Auftrennung der Zellwandzucker

Die Zellwandzucker wurden durch eindimensionale Chromatographie auf Whatman Nr. 1 aufgetrennt.

Als Laufmittel wurde verwendet:

Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 60/40/3/30 (v/v/v/v).

Die Zucker wurden in diesem Laufmittel 2 mal eine Nacht lang aufgetrennt.

Die Neutral- und Aminosucker wurden mit der Silbernitratmethode nach Trevelyan et al. (1950) sichtbar gemacht.

7.4 Gaschromatographische Bestimmung der Zellwandzucker

Die quantitativen Untersuchungen der Zellwandzucker wurden auf einem Research Chromatograph Modell 7620 A der Firma Hewlett-Packard durchgeführt. Die Vorbereitung des Gaschromatographen und der Säulen wurde nach der Methode von Albersheim et al. (1950) durchgeführt.

7.4.1 Aufarbeiten der Proben

5 mg tryptisch verdaute Zellwände wurden mit 0,5 ml 2 n Trifluoressigsäure 2 Stunden bei 100°C im Trockenschrank hydrolysiert. Die zur Trockne eingeblasenen Hydrolysate wurden in 0,5 ml 1m NH_3 aufgenommen und erneut eingengt. Dazu wurde dann 0,5 ml 0,5 n NaOH sowie 10 mg Na-Borhydrid zugefügt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. (Hydrierung der Zucker zu den Zuckeralkoholen.) Das überschüssige Na-Borhydrid wurde durch tropfenweise Zugabe von Eisessig zerstört, die Proben abgeblasen und anschließend 5 mal mit je 1 ml Methanol abgeblasen. Die getrockneten Proben wurden mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt, das Glas zugeschmolzen und 4 Stunden bei 120°C acetyliert. Von diesen acetylierten Proben wurde nach Abzentrifugieren der Partikel 1 bis 2 μl der Probe auf den Gaschromatographen aufgetragen.

7.4.2 Temperaturprogramm

Für die Untersuchungen wurde folgendes Programm gewählt: 6 Minuten isotherm bei 120°C anschließend um 4°C pro Minute auf 180°C aufgeheizt und weitere 4 Minuten bei 180°C gehalten.

Bereich range 10^2 und eine Abschwächung von att. 16

7.4.3 Auswertung der Läufe

Von bekannten Stammlösungen wurden Proben der verschiedenen Zucker wie oben beschrieben aufgearbeitet und für eine Eich-

kurve benützt. Aus der Lage der einzelnen Maxima konnte man die Zucker der unbekannten Zellwandproben quantitativ identifizieren (Abb.1).

7.5 Papierchromatographischer Nachweis von Ribit und Glycerin-Teichonsäuren

Die Zellwandteichonsäure wurde mit Hilfe von 2N HCl bei Zimmertemperatur extrahiert.

Je 15 mg Zellwand wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen mit etwa 1,5 ml 2N HCl suspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellwände abzentrifugiert und der Überstand für 3 Stunden im Einschlußrohr bei 100°C hydrolysiert.

Die Hydrolysate wurden dann auf eindimensionalen Chromatogrammen punktförmig neben den authentischen Substanzen wie Glycerin, Anhydroribit und Ribit aufgetragen.

Die Auftrennung des Hydrolysats erfolgte in Butanol/Pyridin/Essigsäure/H₂O 60/40/3/30 (v/v/v/v) (15 Stunden). Die Chromatogramme wurden mit Schiffs-Periodat-Reagenz (Baddiley et al. 1956) entwickelt, wobei Glycerin innerhalb von 5 Minuten als violetter Fleck, Anhydroribit erst nach 30 Minuten als dunkelblauer Fleck erscheint.

7.6 Quantitative Bestimmung des Phosphatgehaltes der Zellwände (Phosphattest nach Chen et al. 1956)

7.6.1 Reagenzien

Ascorbinsäure (10 %) (im Kühlschrank 6 Wochen haltbar)

Ammoniummolybdat (2,5 %)

Lösung für den Test : (immer frisch ansetzen)

10 ml 6N H₂SO₄

20 ml H₂O dest.

10 ml Ammoniummolybdat

10 ml Ascorbinsäure

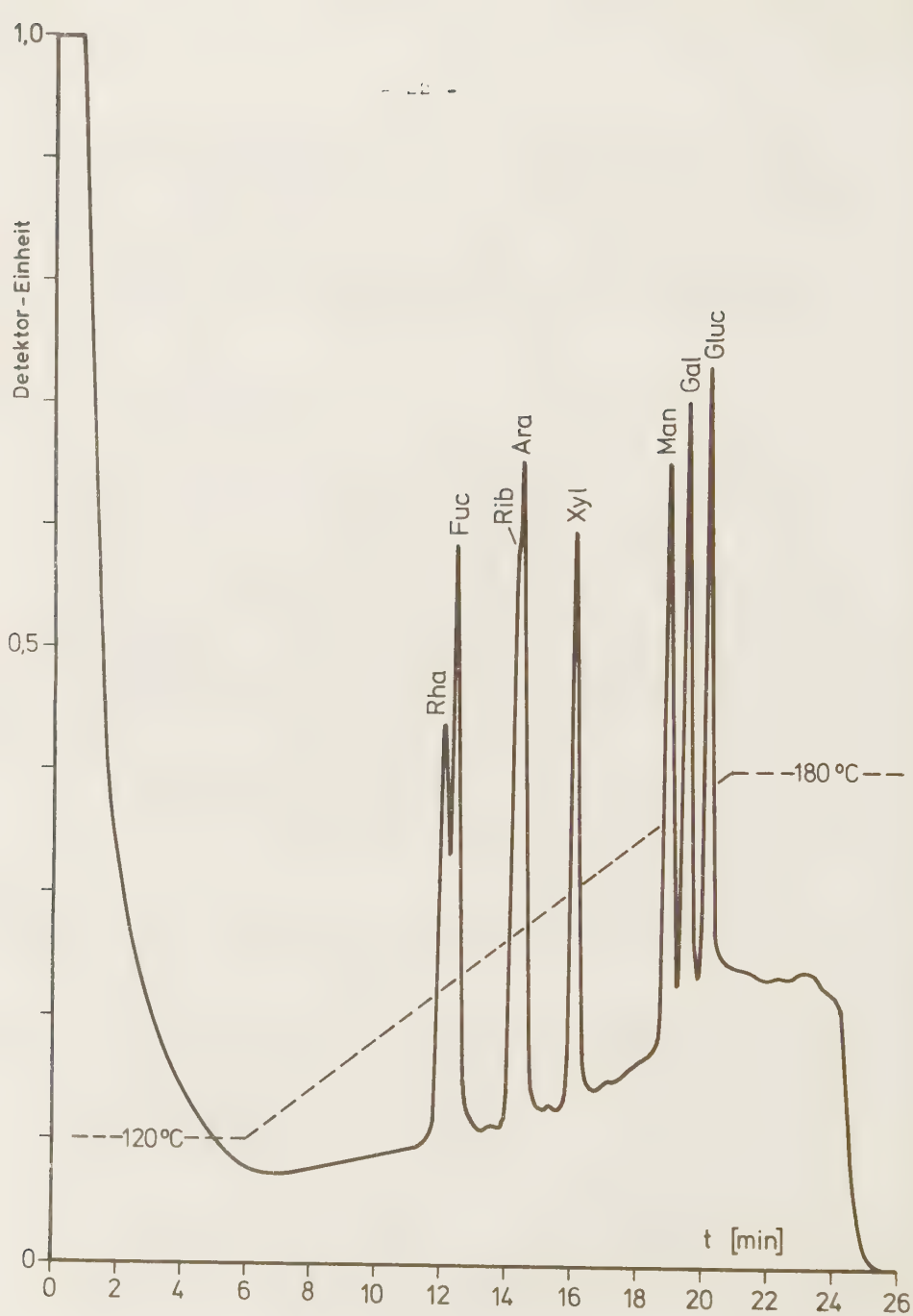


Abb. 1:

Gaschromatographische Auftrennung eines Standardgemisches
von Zuckern (10 $\mu\text{M}/\text{ml}$)

7.6.2 Eichkurve

Standardlösung: KH_2PO_4 über Nacht im Exikator trocknen
143,3 g KH_2PO_4 entspricht 100 g PO_4^{-3} .

Die Standardlösung enthielt 10 $\mu\text{g PO}_4/\text{ml}$.

Die Eichkurve wurde für den Bereich von 2-25 $\mu\text{g PO}_4$ erstellt.

7.6.3 Probenvorbereitung

5 mg Zellwände wurden in großen Reagenzgläser eingewogen, mit 1 ml 6N H_2SO_4 versetzt und solange über dem Bunsenbrenner erhitzt, bis Schwarzfärbung auftrat und SO_2 entwich. Nach Abkühlung wurde der Ansatz mit 0,3 ml H_2O_2 versetzt und erneut solange erhitzt bis die Lösung farblos wurde. Bei Nichtentfärbung wurde nochmals 0,1 ml H_2O_2 zugegeben und solange erhitzt, bis keine Sauerstoffbläschen mehr entwichen. Dann wurde 5 ml Wasser hinzugefügt und nochmals bis zum Aufkochen erhitzt. Nach der letzten Zugabe von 10 ml Wasser enthielt diese Ausgangslösung für den Test 5 mg/15 ml Lösung.

7.6.4 Testansatz

0,5 ml Ausgangslösung (bei Zellwand ohne Teichonsäure 2 ml)

+ 3,5 ml H_2O dest.

+ 4 ml Reagenz

durchschütteln und zwei Stunden bei 37°C inkubieren.

Anschließend die Extinktion gegen Nullwert (H_2O dest. + Reagenz) bei 820 nm messen.

7.6.5 Berechnung

$\mu\text{g PO}_4$ wurden aus der Eichkurve abgelesen.

$$\mu\text{g PO}_4/\text{mg Zellwand} = \frac{15 \times \text{abgelesene } \mu\text{g PO}_4}{\text{mg der eingew. ZW} \times \text{ml einges. Ausgangsl.}}$$

8. Teichonsäureextraktion mit Trichloressigsäure

Zu 1 g gefriergetrockneter Zellwand wurden 20 ml 10%ige TCA gegeben und 24 Stunden bei 4°C mit einem Magnetrührer gerührt. Die milchige Suspension wurde 30 Minuten bei 9 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde eingefroren, das Sediment erneut mit 20 ml TCA gelöst und für weitere 48 Stunden gerührt. Nach Zentrifugieren wurden die beiden Überstände vereinigt, die extrahierten Zellwände mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

Das Fällern der Teichonsäuren erfolgte mit einem fünffachen Überschuß an Äthanol. Nach 24 Stunden bildete sich entweder an der Wand des Gefäßes ein fast durchscheinender oder aber ein flockiger Niederschlag, der durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 g geerntet wurde. Der entstandene Überstand wurde verworfen, der Niederschlag erneut in wenig Äthanol gelöst (5-7 ml) und nochmals abzentrifugiert, um lösliche Bestandteile zu entfernen. Dieser Niederschlag wurde in wenig Wasser aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet. Dabei wurde die Teichonsäure als weißes, hygroscopisches Pulver gewonnen.

9. Dinitrophenylierung von Zellwänden

9.1 Ansatz

20 mg Zellwand wurden in 5 ml H₂O dest. und 2,5 %iger NaHCO₃-Lösung gut vermischt und dann mit einer frisch angesetzten 1,5 %igen äthanolischen 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzollösung versetzt und 14 Stunden im Dunkeln bei 37°C geschüttelt. Die dinitrophenylierten Zellwände wurden anschließend abzentrifugiert und nacheinander mit 30 ml Äther, 30 ml 96 % Äthanol und 50 % Äthanol gewaschen, in etwas Wasser suspendiert und gefriergetrocknet.

9.2 Bestimmung

Es wurden gleiche Mengen tryptisch verdauter und dinitrophenylierter Zellwände mit Hilfe des Aminosäurenanalysators analysiert und aus der Differenz der Aminosäuremengen die Menge an DNP-Aminosäuren berechnet.

10. Glucosevergärung im Puffer

Für die Milchsäurekinetik ruhender Zellen im Puffer wurden aus der betreffenden Wachstumsphase 100 ml Zellsuspension entnommen, bei 3 000 U/min 20 Minuten abzentrifugiert und zweimal mit 0,1 mol Phosphatpuffer pH 6,4 gewaschen. Die Zellen wurden in 10 ml Puffer aufgenommen und mit 1 % Glucose versetzt.

Die Gärung wurde durch pH-Messung verfolgt und spätestens bei einem pH-Wert von 4,9 mit 1N NaOH auf pH 6 zurücktitriert.

11. Aufschluß der Zellen und Herstellung des Rohextraktes für die enzymatischen Untersuchungen

Für die Bestimmung der Aktivität der D- und L-LDH im Rohextrakt wurden die Stämme auf MRS-Medium gezüchtet und die Zellen in den entsprechenden Entwicklungsphasen geerntet. Nach Abzentrifugieren und Waschen mit 0,1 mol Phosphatpuffer pH 6,4, der einen Zusatz von 4×10^{-3} Mercaptoäthanol enthielt, wurden die Zellen in wenig Phosphatpuffer mit DNase behandelt (Spatelspitze), mit Hilfe der French-Press aufgebrochen und 20 Minuten bei 20 000 U/min in der Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand (= Rohextrakt) wurde über Nacht gegen 0,01 mol Phosphatpuffer pH 6,4 mit 0,04 % EtSH (Mercaptoäthanol) dialysiert.

12. Test zur Bestimmung der D- und L-LDH im Rohextrakt

Die enzymatischen Umsätze zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden im Photometer bei 366 nm gemessen und aus der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde die jeweilige Aktivität ermittelt.

12.1 Standardtest für die Reaktion der D- und L-LDH in unphysiologischer Richtung mit D- und L-Lactat als Substrat

Ansatz pro Küvette: ($V_{\text{gesamt}} = 3 \text{ ml}$)

Bezeichnung	Einsatz
Glycin-Hydrazin Puffer pH 9	2,38 ml
Lactat (D- oder L, 100 mg/ml)	0,40 ml
NAD (30 mg/ml)	0,20 ml

mischen, dann Zugabe von 0,02 ml Rohextrakt, erneut mischen und dE/Minute messen.

Der Rohextrakt wurde solange verdünnt, bis dE/min kleiner als 0,2 war.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach der Gleichung:

$$\frac{U}{\text{ml}} = \text{dE/min} = \frac{V}{E_{366} \times d \times v}$$

V = Gesamtvolumen in der Küvette (3 ml), $E_{366} = 3,3$, $d = 1 \text{ cm}$ (Lichtweg), v = eingesetztes Volumen der unverdünnten Rohextraktlösung.

12.2 Standardtest für die Reaktion der D- und L-LDH in physiologischer Richtung mit Pyruvat als Substrat

Ansatz pro Küvette: ($V_{\text{gesamt}} = 1,01$ (bzw. 1,08) ml)

Bezeichnung	Einsatz
Imidazolpuffer 0,1 mol, pH 7,1	0,80 ml
Pyruvat (0,17 mol)	0,10 ml
NADH + H^+ (5 mg/ml)	0,10 ml
(FDP 16 mg/ml)	(0,05 ml)
($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 112 mg/ml)	(0,01 ml)

mischen, dann Zugabe von 0,01 ml Rohextrakt, erneut mischen und dE/min messen.

Zur Überprüfung auf FDP- und Mn-Aktivierung wurde dem Test Mn und FDP in den oben angegebenen Konzentrationen zugegeben.

13. Optischer Milchsäuretest (Hohorst 1970, Stetter 1973)

Die Bestimmung der beiden Milchsäureisomere erfolgte mit Hilfe des optischen Tests genau wie bei Stetter beschrieben. Zur Bestimmung von L-Lactat wurde Kaninchenmuskel-LDH (Boehringer), im Falle von D-Lactat, D-LDH aus *Leuconostoc mesenteroides* verwendet.

14. Proteinbestimmung nach Lowry et al. 1951

Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Reagenz nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

Die Aufstellung der Eichkurve erfolgt mit Rinderserumalbuminlösung (10 mg/ml)

15. Disc-Elektrophorese (Maurer 1968 modifiziert nach Stetter 1973)

Die Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel wurde nach Stetter durchgeführt.

Es wurden 10 μ l eines dialysierten Rohextraktes gemeinsam mit etwas Saccharose (3 mg/ml) und 0,05 ml einer 0,1 %igen Bromphenolblaulösung als Frontmarkierung auf das Gel aufgetragen. Als Referenz diente 0,02 ml einer dialysierten Suspension von Kaninchen-LDH-iso-I (2 mg/ml). Der Lauf wurde dann beendet, wenn der untere Rand des Bromphenolblaus am Ende des Gels angelangt war. Anschließend wurden die Gele aus den Röhrchen entfernt und in die Entwicklerlösungen gegeben.

15.1 Entwicklung der Gele

Die Farbreaktion der LDH beim Entwickeln beruht auf der Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium durch NADH mit Hilfe von Phenazinmethosulfat (Serva).

Es wurde in beiden Reaktionsrichtungen getestet:

a) Physiologische Richtung vom Pyruvat zum Lactat

pro Entwicklerröhrchen:

2 ml Tris 0,1 mol pH 7,5

10 mg Pyruvat

5 mg NADH

Die Gele wurden 10 Minuten mit dieser Reaktionslösung inkubiert. Wenn die LDH Banden bei Betrachtung im UV-Licht (350 nm) als dunkle Banden auf hellem Untergrund zu erkennen waren, so wurden die Gele mit folgender Lösung entwickelt:

pro Röhrchen:

3 ml Tris 0,1 mol pH 8,6

6 mg Nitroblau-Tetrazolium

1 mg Phenazinmethosulfat

Da bei dieser Reaktion NADH verbraucht wird, wurde das Gel an der Stelle, an der sich die LDH befand, nicht angefärbt, während das übrige Gel violett erschien.

b) Unphysiologische Richtung vom Lactat zum Pyruvat

(Markert et al. (1959) nach Stetter modifiziert)

2 ml Tris 0,1 mol pH 8,6

3 mg NAD^+

3 mg D- oder L-Lactat (reines Isomer)

2 mg Nitroblau-Tetrazolium

0,3 mg Phenazinmethosulfat

Bei der Umsetzung von Lactat zu Pyruvat wird NADH gebildet, so daß an der Stelle, an der sich die LDH befand, Violett-färbung einsetzte, während das übrige Gel farblos erschien.

15.2 Berechnung

Die Wanderungsstrecken der Enzymbanden und der Bromphenolblaubande wurden ausgemessen und auf die Laufstrecke der L-LDH-iso 1 Bande und deren BPB-Bande bezogen. Dazu wurde die Referenz 1 gesetzt. Die Ergebnisse zweier LDH mit ähnlichen Wanderstrecken wurde durch Coelektrophorese überprüft, indem beide Rohextrakte zusammen auf ein Gel aufgetragen wurden.

16. Isolierung der DNS und G+C-Bestimmung

16.1 Isolierung der DNS (Marmur 1961)

4 g Zellen wurden mit Glasperlen (0,25 - 0,30 mm, Fa. Braun-Apparatebau, Melsungen) zerschlagen. Nach 5 Minuten waren nahezu alle Zellen aufgebrochen und die Zellbestandteile konnten über eine Schott-G-1-Fritte von dem Überstand abgetrennt werden. Der Rohextrakt wurde nun mit Natrium-Laurylsulfat (8 %) versetzt und bei 65°C 10 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung erfolgte eine Zugabe von 20 % Natriumperchlorat. Dieser Ansatz wurde anschließend mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24 :1) versetzt und 20 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die entstandene Emulsion wurde bei 3 000 U/Minuten abzentrifugiert, wobei sich drei Phasen bildeten. Die obere Phase enthielt alle Nucleinsäuren und wurde deshalb vorsichtig mit einer Pipette abgehoben. Bei Trübung der wässrigen Phase wurde diese bei 20 000 U/Minute abzentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge) und somit von allen Zellresten befreit. Nach nochmaligem Ausschütteln des Überstandes mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch und Abzentrifugieren wurde in der wässrigen Phase eine Alkoholfällung durchgeführt. Dazu wurde über die Lösung vorsichtig 2 Volumen Äthanol geschichtet und durch langsames Rühren der Interphase mit einem Glasstab wurden die Nucleinsäuren aufgewickelt oder gefällt. Nach Abtropfen des Niederschlages am Glasstab wurde dieser in 9 ml 0,1 SSC gelöst und mit einem ml 10 SSC auf 1 SSC ge-

bracht. Nach dieser 1. Alkoholfällung folgten so viele Ausschüttelungen mit Chloroform/Isoamylalkoholgemisch, bis nur noch sehr wenig Protein in der Interphase zu erkennen war (5-6 mal). Nach einer 2. Alkoholfällung wurden die Nucleinsäuren erneut in SSC gelöst und mit 50 µg/ml RNase bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Die folgende Ent-eiweissung durch Ausschütteln wurde nun solange durchgeführt, bis keine Trübung mehr in der Interphase zu erkennen war (bis zu 12 mal). Bei der darauffolgenden 3. Alkoholfällung wurden die Nucleinsäuren wieder in 9 ml 0,1 SSC gelöst und einem ml Acetat-EDTA und dann die DNS unter heftigem Rühren mit einem Glasstab und tropfenweise Zugabe von 0,54 Volumen Isopropanol aufgewickelt oder zumindest gefällt. Der Niederschlag wurde anschließend mit steigenden Konzentrationen Äthanol (75, 80, 85, 90, 96 %) gewaschen, der Alkohol abgeblasen und nach Zugabe von 10 ml 1 SSC wurde diese DNS-Lösung mit einem Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

16.2 Bestimmung des G+C-Gehaltes

16.2.1 Prinzip

Beim Schmelzen der DNS zerfällt diese in ihre zwei Komplementärstränge. Diese Trennung der DNS-Helix geschieht umso leichter, je unstabiler die DNS ist, d.h. je weniger H-Bindungen sie aufweist. Da die G+C-Basenbindungen mehr H-Bindungen besitzen (3) als die entsprechenden A-T-Basenbindungen (2), ist immer die DNS stabiler, die mehr G+C-Bindungen zeigt.

Als Maß für die Stabilität der DNS wird der T_m angegeben, das ist die Temperatur, bei der die Hälfte der maximalen Extinktion bei 260 nm erreicht wird (Doty et al. 1959). Da die thermische Denaturierung der DNS durch Extinktionserhöhung bei 260 nm (Absorptionsmaximum der DNS) leicht verfolgbar ist, eignet sich die photometrische Messung des Schmelzvorganges zur Bestimmung des T_m sehr gut.

16.2.2 Messung des Schmelzpunktes

Zur Messung der thermischen Denaturierung wurde ein Zeiss Spektralphotometer (M4Q III) verwendet und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Temperatur wurde durch ein regulierbares Wasserbad (Glycerin/H₂O-Gemisch) eingestellt und durch geeichte Thermometer, die in die Küvette tauchten, überprüft.

Für die Bestimmung des T_m wurde die DNS-Lösung auf 0,1 SSC gebracht und zur Feststellung der Verdunstung des Lösungsmittels die Küvette vor der Messung gewogen. Da zur Berechnung des T_m alle erhaltenen Extinktionswerte während der Temperaturerhöhung durch den Extinktionswert bei 25°C dividiert wurden, wurde dieser in 20-minütigen Abständen solange gemessen, bis ein konstanter Wert erreicht war. Die thermische Denaturierung wird anschließend mit einem hohen Temperatursprung von 25°C auf 50°C begonnen und bei Erhöhung um 2°C pro 10 Minuten fortgeführt.

16.2.3 Berechnung des T_m (Mandel und Marmur 1968)

Die steigenden Extinktionswerte während der thermischen Denaturierung wurden auf die Verdunstung des Lösungsmittels und die thermische Ausdehnung der Lösung korrigiert und dann mit dem Extinktionswert bei 25°C dividiert.

$$\text{Relative Extinktion} = \frac{E_t \times f_{\text{Tab}}}{F_{\text{Verlust}} \times E_{25^\circ\text{C}}}$$

wobei:

E_t die Extinktion der Probe zur Zeit t ist

f_{Tab} die Volumenausdehnung der Lösung (Tabelle 1)

F_{Verlust} Volumenverlust der Lösungsmittel durch Verdunstung

$E_{25^\circ\text{C}}$ die Extinktion bei 25°C.

Tabelle 1:

Das Wasservolumen in Relation zu seinem Volumen bei 25°C
(aus Mandel und Marmur, 1968).

T	V_T/V_{25}	T	V_T/V_{25}	T	V_T/V_{25}
60	1.0141	76	1.0234	91	1.0336
61	1.0146	77	1.0240	92	1.0343
62	1.0152	78	1.0247	93	1.0351
63	1.0157	79	1.0253	94	1.0358
64	1.0162	80	1.0260	95	1.0365
65	1.0168	81	1.0266	96	1.0373
66	1.0174	82	1.0273	97	1.0380
67	1.0180	83	1.0280	98	1.0388
68	1.0185	84	1.0287	99	1.0396
69	1.0191	85	1.0293	100	1.0404
70	1.0197	86	1.0300	101	1.0411
71	1.0203	87	1.0308	102	1.0419
72	1.0209	88	1.0314	103	1.0426
73	1.0215	89	1.0321	104	1.0433
74	1.0221	90	1.0329	105	1.0441
75	1.0228				

Trägt man den korrigierten Extinktionswert gegen die Temperatur auf, so erhält man die für den Stamm typische Schmelzkurve. T_m entspricht dann dem halben Extinktionswert. Zur Berechnung des G+C-Gehaltes wurde die Gleichung von De Ley (1970), Marmur und Doty (1962) verwendet, die ein lineares Verhältnis zwischen dem T_m der DNS und dem G+C-Gehalt fanden.

$$GC = (T_m - 69,4) \times 2,44$$

17. DNS-Hybridisierung

17.1. DNS-Isolierung (nach Marmur modifiziert)

Die Bakterien wurden auf MRS-Medium gezüchtet und bei einer optischen Dichte von etwa 0,8 für die unmarkierte und in der stationären Wachstumsphase für die markierten DNS, geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit Leitungswasser gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Zur DNS-Isolierung wurden etwa 15 g Zellen (Naßgewicht) in 150 ml Saline EDTA aufgenommen, mit einem Homogenisator suspendiert und mit Lysozym inkubiert (15 mg). Für die Lyse von *L.acidophilus*-Stämmen wurden maximal 16 Stunden benötigt. Sie wurde bei 37°C auf dem Schüttelbrett durchgeführt. Erfolgreiche Lyse wurde durch zunehmende Viskosität der Zellsuspension erkennbar. Nach Ablauf der Inkubation wurde 15 ml 25 %iges Natriumlaurylsulfat zu der Lösung gegeben. Das vollständige Klarwerden der Lösung deutete auf eine vollkommene Lyse hin. Dieser Ansatz wurde anschließend noch für 10 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert und vor der weiteren Behandlung auf Zimmertemperatur gebracht. Erschien die Suspension noch trüb, so wurden die Zellreste bei 3 000 U/Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis zur 1 mol Endkonzentration mit Natriumperchlorat versetzt, 4 Minuten geschüttelt, mit gleichem Volumen Chloroform aufgefüllt und erneut 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Beim anschließenden Zentrifugieren entstanden wie unter 16.1 schon erwähnt drei Phasen, wobei die wässrige Phase die DNS enthielt. Diese wurde abgehoben und sofort einer Alkoholfällung unterzogen. In diesem Falle war es wichtig, daß sich die DNS um den Glasstab wickeln ließ. Sie wurde durch wiederholtes Ausschütteln mit Chloroform gereinigt und dann ein zweites Mal mit Alkohol gefällt. Nach dieser Fällung folgte zur Entfernung der RNS auch eine Behandlung mit RNase (50 µg/ml) über Nacht bei 37°C. (Die RNase wurde vor Zugabe in 0,1 SSC gelöst.) Daran schloß sich eine Behandlung mit Proteinase K (10 µg/ml;

über Nacht). Durch erneute Chloroformausschüttelungen wurde die Proteinase entfernt. Die spezifische Fällung der DNS erfolgte nun unter den gleichen Bedingungen wie unter 16.1 und diese DNS wurde ebenso in 0,1 SSC gelöst.

Zur weiteren Reinigung wurde noch eine Dialyse in 3-4 L Wasser EDTA 0,02 M pH 7 über 4 Tage durchgeführt (der Puffer wurde nach 2 Tagen einmal gewechselt).

Die Reinheit und Menge der DNS wurde dann im Photometer bei 260 nm gegen den Dialysepuffer als Leerwert gemessen. Aus 15 g L.acidophilus-Zellen erhielt man ungefähr 2,2 g DNS. Zur weiteren Aufbewahrung der DNS-Lösung wurde diese mit einem Tropfen Chloroform versetzt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

17.2 Zerlegung der DNS in Einzelstränge (alkalische Denaturierung nach Birnstiel et al., 1972)

Die isolierte DNS (etwa 1 µg in 6 ml 6 SSC aufgenommen) wurde mit gleichem Volumen 1N NaOH bei Zimmertemperatur 30 Minuten alkalisch denaturiert. Dieser Ansatz wurde nach Abkühlung auf 4°C durch Zugabe von 4 Volumen einer Lösung, die 3M NaCl, 1N HCl und 1M Tris pH 8 im Verhältnis 2:1:1 enthielt, neutralisiert.

17.3 Beladen der Membranfilter mit den DNS-Einzelsträngen

Ebenso wie die Denaturierung wurde das Beladen der Filter in der Kühlkammer bei 4°C durchgeführt.

Sartorius-Nitrocellulose-Membranfilter (25 mm Ø, 0,2 µ Porengröße) wurden in 3 SSC aufgeweicht und auf einer Filtrierbank mit je 10 ml 3 SSC vorgewaschen. Anschließend wurde die kalte neutralisierte DNS-Lösung über die Filter gegeben und zweimal durchfiltriert. Das Filtrat wurde photometrisch bei 260 nm gemessen und aus der Differenz zur Menge an eingesetzter DNS wurde der Anteil an gebundener DNS berechnet. Zur Entfernung nur lose gebundener

DNS wurden die Filter noch 5-6 mal mit 3 SSC gewaschen und die Gesamtmenge an gebundener DNS auf den Filtern durch Messungen der einzelnen Waschwasser errechnet (1 μg DNS entspricht einer Extinktion von 0,024 bei 260 nm). Der Gehalt an gebundener DNS lag meist zwischen 96 und 160 μg /Filter.

Die beladenen Filter wurden über Nacht bei Zimmertemperatur vorgetrocknet, dann 4 Stunden im evakuierten Exsikkator über P_2O_5 bei 80°C getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

17.4. Messung der DNS-Menge (Burton)

17.4.1. Prinzip

Dische fand 1930, daß DNS eine blaue Farbe ergab, wenn man sie mit einer Lösung von Diphenylamin in Eisessig, die 2,75 % H_2SO_4 enthielt, bei 100°C erhitzte. Diese Reaktion wird durch freie 2-Desoxyribose bestimmt. Die Farbe war der Menge an DNS proportional und so konnte diese Methode zur quantitativen Bestimmung der DNS verwendet werden. Burton fand 1956 einen verbesserten Test, indem er ein verändertes Diphenylamin verwendete, welches Acetaldehyd enthielt, so daß die Proben nur bei 30°C für 17 Stunden inkubiert werden müssen. Diese Methode ist gegenüber der Methode von Dische 3,5 mal sensitiver und sehr viel spezifischer.

17.4.2. Reagenzien

DNS-Standard:

Eine reine DNS-Präparation (Rinderthymus) wurde in 5 mM NaOH gelöst (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Für den Test wurde diese mit gleichem Volumen HClO_4 versetzt und 20 Minuten bei 70°C inkubiert.

Diphenyl-Reagenz:

1,5 g destilliertes Diphenylamin wird in 100 ml redestilliertem Eisessig aufgenommen und mit 1,5 ml Eisessig versetzt. Diese Lösung war im Dunkeln bei Zimmertemperatur für einige Zeit haltbar. Bei Gebrauch wurde 0,2 ml einer wässrigen

Acetaldehydlösung zu 20 ml dieses Reagenz gegeben und so in den Test eingesetzt.

17.4.3 Durchführung des Testes

Ansatz im Reagenzglas:

Filter (oder 0,5 ml einer DNS-Lösung) + 0,5 ml HClO_4 umschütteln und 20 Minuten bei 70°C inkubieren, dann Zugabe von 0,5 ml H_2O (bei der Lösung keine Zugabe) und 2 ml Diphenylaminreagenz, umschütteln und 18 Stunden bei 30°C inkubieren. Die Messung erfolgt bei 600 nm im Photometer, als Leerwert diente Wasser oder ein Leerfilter.

17.4.4 Eichkurve

Von dem DNS-Standard wurden 5, 10, 25 und 50 µg in den Test eingesetzt und die Eichkurve aufgestellt. Mit Hilfe dieser konnte man die DNS-Menge in der Lösung oder auf dem Filter gebunden bestimmen. Der Meßbereich des Testes lag zwischen 5 µg (opt. Dichte von 0,05) und 100 µg DNS (o.D. 1).

17.5 Präparation der markierten DNS

2L MRS-Medium wurden mit 0,2 ml einer ^3H -Thymidinlösung (10,5 Ci/mmol spez. Akt., 1 mCi/ml Konz., New England Nuclear) versetzt und mit einer Übernachtskultur von *L. acidophilus* beimpft. Da die markierte DNS nicht unbedingt langkettig sein mußte, wurden die Zellen erst in der spät-logarithmischen Wachstumsphase geerntet und wie unter 17.1 aufgearbeitet.

17.6 Vorinkubation der beladenen Filter mit Denhardt-Reagenz (Denhardt, 1966)

17.6.1 Prinzip

Unspezifische Bindungen denaturierter oder einzelsträngiger DNS auf den beladenen Filtern können durch Vorinkubation der Filter vor der Hybridisierung mit einer Albuminlösung verhindert werden.

17.6.2 Reagenz

Die Lösung enthält 0,02 % Ficoll (MW 400 000), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (MW 360 000) und Rinderalbumin in 3 SSC gelöst.

17.6.3 Ansatz

Die im Exsikkator bei 4°C gelagerten mit DNS beladenen Filter wurden in 4 gleich große Sektoren geschnitten und je ein Sektor in einem Scintillationsgläschen mit 1 ml Denhardt-Lösung überschichtet. Dieser Ansatz wurde für 3 Stunden bei 36°C (entsprechend der Hybridisierungstemperatur) auf dem Schüttelbrett inkubiert.

17.7 Fragmentierung der markierten DNS

Die markierte DNS wurde mit Hilfe der French-Press 3 mal bei 10 000 psi in kleine Stücke geschert.

17.8 Denaturierung der markierten DNS

Kurz bevor die in kleine Stücke gescherte markierte noch doppelsträngige DNS für den Hybridisierungsansatz verwendet wurde, wurde sie im Einschlußrohr bei 100°C im Ölbad 2 mal 10 Minuten erhitzt und dann sofort in ein Eisbad gegeben.

17.9 Hybridisierungsansatz

Die in Denhardt-Lösung vorinkubierten Filter wurden entleert und die Gläser für ein paar Minuten zum Abtropfen mit der Öffnung nach unten aufgestellt. Zu jedem Sektor wurden nun 1 ml der zerkleinerten, markierten DNS-Lösung in 3 SSC und 30 % Formamid gegeben (etwa 1 µg DNS) und der Ansatz für 22 Stunden bei 36°C auf dem Schüttelbrett inkubiert. Vor diesem Ansatz wurde die markierte DNS-Lösung im Scintillationszähler gemessen. Nach Ablauf der Hybridisierung wurde die Lösung mit der markierten DNS abgegossen, die Sektoren mit

je 10 ml 3 SSC 3 mal gewaschen und für 2-4 Stunden bei 80°C getrocknet.

Zur Messung der gebundenen Radioaktivität wurden die getrockneten Sektoren in 10 ml wasserfreien Scintillationscocktail gegeben und 2 mal 10 Minuten im Beckman Scintillationszähler gezählt.

17.10. Berechnung der % Homologie

% gebundene markierte DNS:

$$\% \text{ geb. DNS} = \frac{\text{cpm geb. DNS am Filter} \times 100}{\text{cpm eingesetzte DNS}}$$

Homologie:

$$\% \text{ Homologie} = \frac{100 \times \% \text{ geb. DNS an nicht homologen Filter}}{\% \text{ geb. DNS am homologen Filter}}$$

III. Ergebnisse

A. Klassische Merkmale

1. Racematbildung bei L.acidophilus

1.1. Isomerenverhältnis

1.1.1 Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Untersuchungen an L.acidophilus zeigten während verschiedener Wachstumsphasen ein unterschiedliches Isomerenverhältnis (Garvie 1967, Stetter 1971). Auf Grund dieser Beobachtungen wurden einige Vertreter dieser Art auf ihr Milchsäureverhältnis in der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase untersucht.

1.1.1.1 Unterschied im Isomerenverhältnis in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase bei verschiedenen Stämmen

Die Tabelle 2 zeigt, daß bei allen untersuchten Stämmen in der logarithmischen Phase ein L-Lactat Überschuß oder wenigstens 50 % L-Milchsäure festgestellt wurde. In der anschließenden stationären Phase blieb die D-Lactatproduktion entweder weiter hinter der von L-Lactat zurück, verstärkte sich bis zur Bildung von Racemat oder führte zu einem Überwiegen der D-Lactatkonzentration.

Danach lassen sich folgende 6 Gruppen bilden, die allerdings wie Tabelle 2 zeigt nicht immer scharf voneinander getrennt werden können :

Tabelle 2:

Verhältnis der Milchsäure-Isomeren verschiedener Stämme während des Wachstums.

Bezeichnung	log.Phase		stat.Phase		Typ
	L (%)	D (%)	L (%)	D (%)	
DSM 20077	55	45	50	50	1
F 164	46	54	48	52	1
R I	55	45	45	55	1
538	58	42	44	56	1
SA 24	53	47	47	53	1
CHNI-2-7	48	52	48	52	1
H 27a	49	51	49	51	1
T 50	49	51	48	52	1
Omniflora	47	53	41	59	1
A 263-19	57	43	41	59	1
34-26	54	46	46	54	1
CHN J-1-6	56	44	47	53	1
CHN 22-1-10	59	41	50	50	1
CHN I-2-4	59	41	45	55	1
I-36-I	58	42	49	51	1
XXV JR	59	41	48	52	1
Kd 16-3	57	43	48	52	1
T 91	53	47	43	57	1
D 3	59	41	33	67	2
D 4	56	44	33	67	2
SA 13	58	42	40	60	2
H 18 b	54	46	38	62	2
I-69-I	52	48	62	38	3

Fortsetzung Tabelle 2

Bezeichnung	log.Phase		stat.Phase		Typ
	L (%)	D (%)	L (%)	D (%)	
69 K	61	39	54	46	4
Sp 34	76	24	46	54	4
Sc	93	7	48	52	4
CHN I-4	62	48	42	58	4
SA 12	83	17	52	48	4
SA 16	75	25	55	45	4
F 177 a	68	32	48	52	4
F 169 a	93	7	48	52	4
VII JS	68	32	50	50	4
XXIX J	67	33	46	54	4
A 201-7	62	38	44	56	4
PN I-9	64	46	47	53	4
PN I-2-3	71	29	45	55	4
CHN 4-2-5	77	23	51	49	4
AM 63	72	38	37	63	5
ATCC 314	92	8	65	35	6
B 39/4b	86	14	70	30	6
DSM 20079	74	26	60	40	6
A 244-1	68	32	59	41	6
SA 9	84	16	62	38	6
DSM 20242	92	8	80	20	6

1. Stämme, die sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Wachstumsphase etwa gleiche Mengen an D- wie an L-Milchsäure bilden.
2. Stämme, die in der logarithmischen Wachstumsphase gleiche Konzentrationen an D- und L-Milchsäure zeigten, die aber in der stationären Phase einen Überschuß an D-Milchsäure aufwiesen.
3. Stämme, die wie unter 2. in der logarithmischen Wachstumsphase ein D/L-Milchsäureverhältnis von 1:1 zeigten, am Ende des Wachstums aber mehr L-Milchsäure gebildet hatten.
4. Stämme, die während des logarithmischen Wachstums einen Überschuß an L-Milchsäure bildeten, am Ende des Wachstums aber gleiche Konzentrationen beider Isomere aufwiesen.
5. Stämme, die sich in der logarithmischen Phase wie die Stämme unter 4. verhielten, in der stationären Wachstumsphase aber einen Überschuß an D-Milchsäure gebildet hatten.
6. Stämme, die sowohl während des logarithmischen als auch stationären Wachstums einen Überschuß an L-Milchsäure zeigten.

Für 4 Stämme aus 3 verschiedenen Gruppen wurden genauere Kinetiken der Milchsäurebildung aufgenommen.

1.1.1.2 Kinetik bei *L.acidophilus* AM 63 Gasser

Wie Abb. 2 zeigt, bildete AM 63 während der logarithmischen Phase noch einen leichten Überschuß an L-Milchsäure. Nach etwa 9 Stunden lag bei einer optischen Dichte von 0,9 ein Isomerenverhältnis von 1:1 vor. In der Verzögerungsphase stieg nun die Konzentration an D-Milchsäure erheblich an und lag in der frühen stationären Phase mit mehr als 9 mg/ml fast doppelt so hoch wie die L-Milchsäurekonzentration.



Abb. 2:

Kinetik der Milchsäurebildung während des Wachstums bei *L. acidophilus* AM 63 Gasser.

Das Isomerenverhältnis änderte sich somit von 0,4 in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte von 0,5) zu einem Wert von 1,7 in der stationären Wachstumsphase.

1.1.1.3 Kinetik bei L.acidophilus DSM 20242

Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, bildete DSM 20242 während der logarithmischen Wachstumsphase praktisch nur L-Milchsäure. Erst in der Verzögerungsphase, etwa 8 Stunden nach Animpfung, stieg bei einer optischen Dichte von 0,5 die D-Milchsäurekonzentration an und erreichte nach 24 Stunden in der stationären Wachstumsphase noch 20 % gegenüber 80 % L-Milchsäure.

1.1.1.4 Kinetik bei L.acidophilus DSM 20077

Abb. 4 zeigt das D/L-Milchsäureverhältnis während des Wachstums von DSM 20077. Bei diesem Stamm ging die L-Milchsäurebildung mit der D-Milchsäurebildung parallel. Die Konzentration an L- und D-Milchsäure war über den gesamten Wachstumsverlauf gleich, und es ergab sich somit zu allen Zeiten ein D/L-Milchsäureverhältnis von 1.

1.1.1.5 Kinetik der L-acidophilus DSM 20079

DSM 20079 zeigt etwa den gleichen Verlauf wie DSM 20242 (Abb.5). Im Unterschied zu DSM 20242 setzt die D-Milchsäurebildung früher und stärker ein, bleibt aber immer hinter der Bildung der L-Milchsäure zurück. Die Messung der Milchsäurekonzentration im Medium während der logarithmischen Wachstumsphase ergab ein Isomerenverhältnis von 0,3, während in der stationären Phase ein D/L-Verhältnis von 0,7 vorlag.



Abb. 3:

Kinetik der Milchsäurebildung während des Wachstums bei *L. acidophilus* DSM 20242.

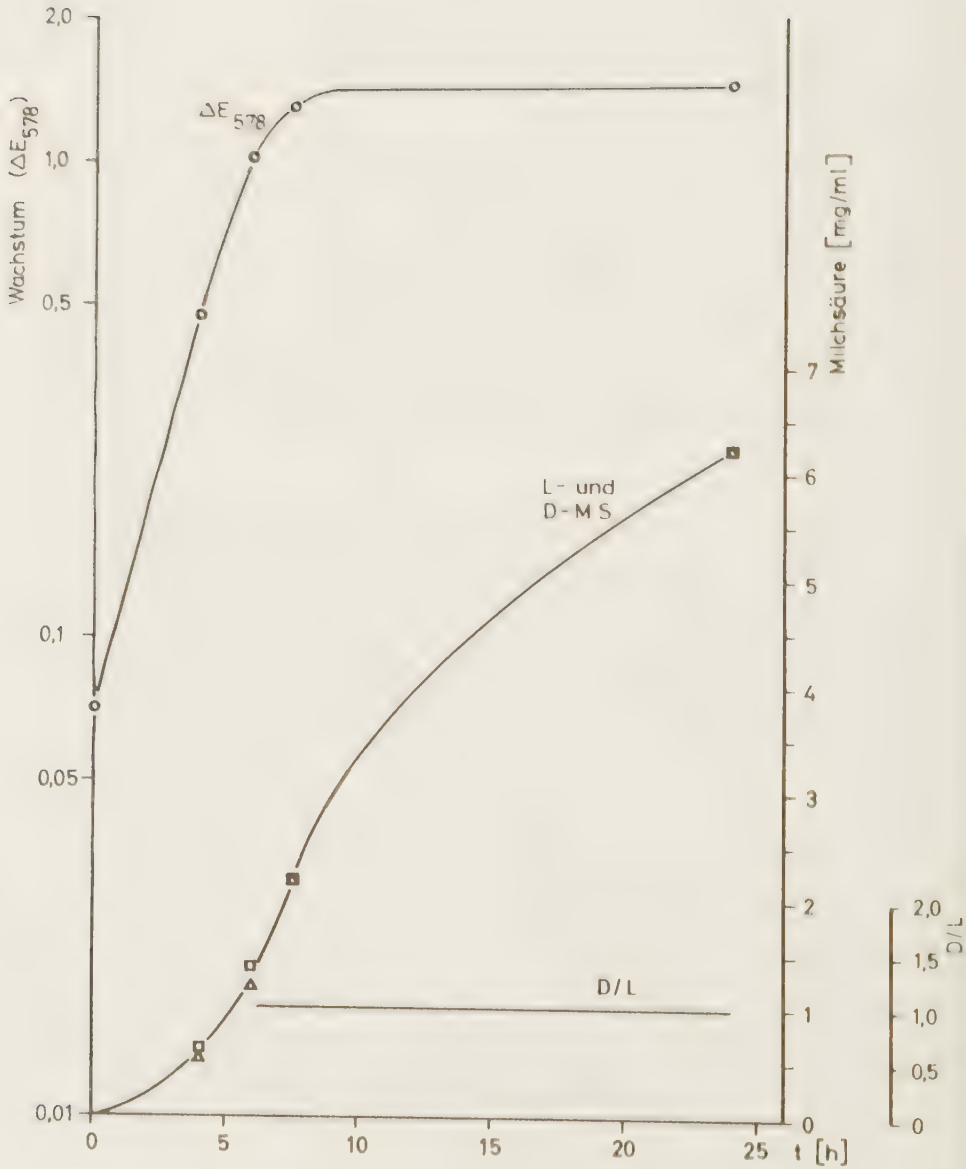


Abb. 4:

Kinetik der Milchsäurebildung während des Wachstums bei *L. acidophilus* DSM 20077.

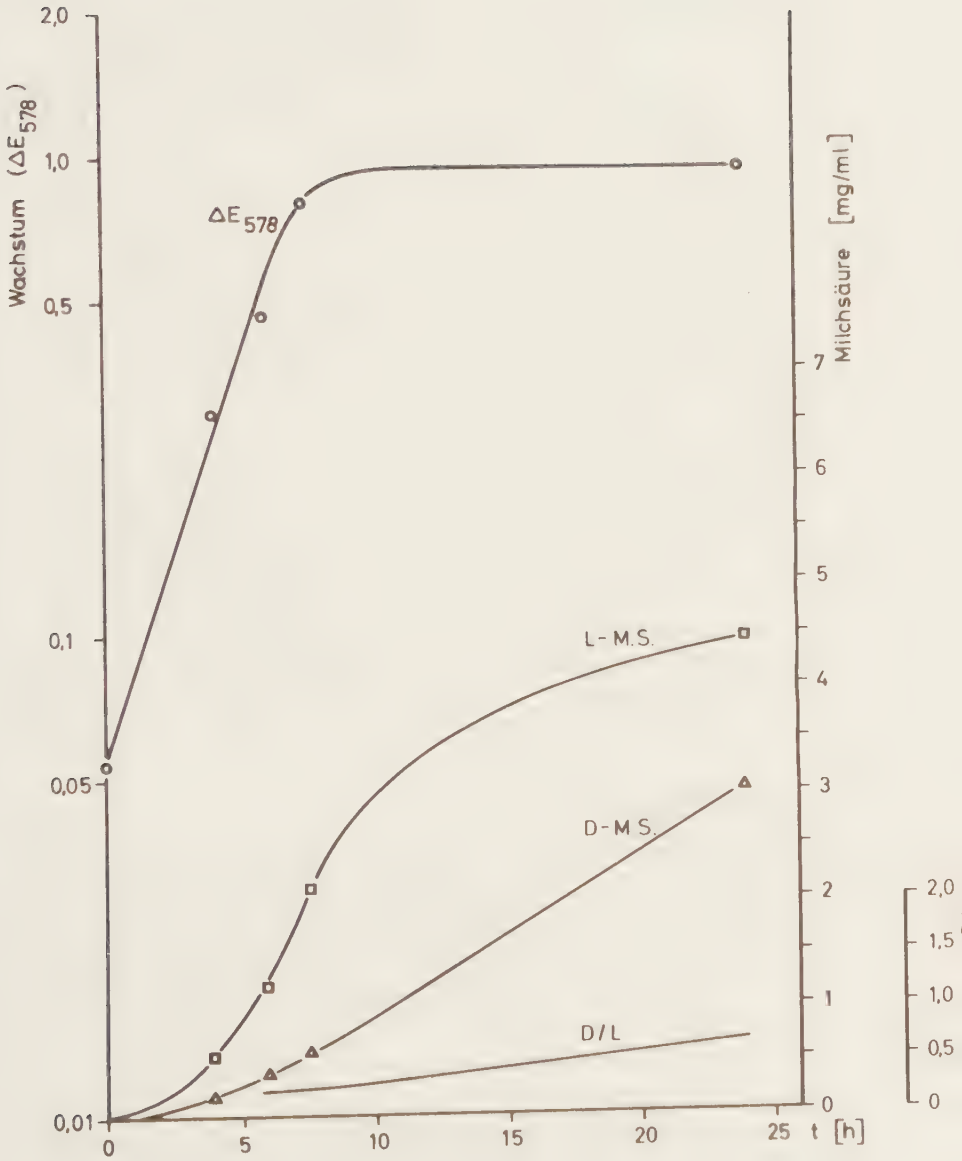


Abb. 5:

Kinetik der Milchsäurebildung während des Wachstums bei *L. acidophilus* DSM 20079.

1.1.2 Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Zellen

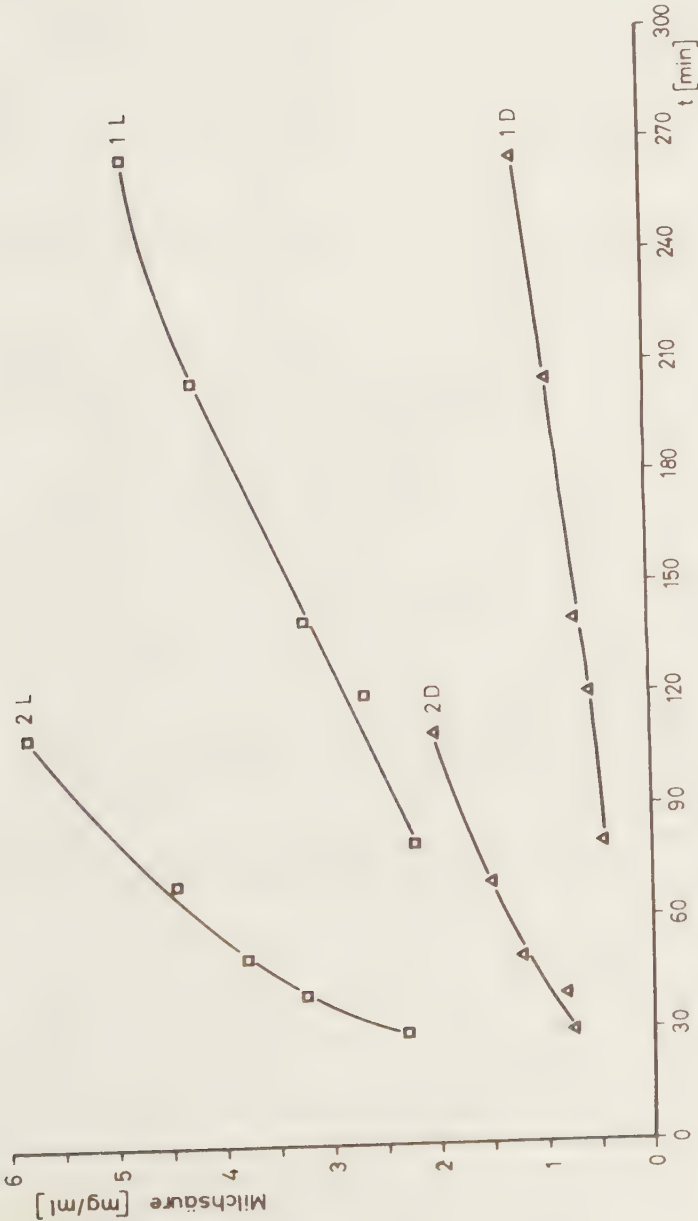
Wie Abb. 2 und 3 zeigen, setzt die D-Milchsäurebildung bei AM63 und DSM 20242 erst später als die L-Milchsäurebildung ein, wobei im Falle des *L.acidophilus* AM63 die D-Milchsäurekonzentration am Ende des Wachstums höher als die der L-Milchsäurekonzentration lag, während im Falle des *L.acidophilus* DSM 20242 die D-Milchsäurekonzentration stets geringer blieb als die L-Milchsäurekonzentration. Da bei beiden Stämmen die D-Milchsäurebildung erst in der Verzögerungsphase einsetzte, wurde untersucht, ob dies durch die Veränderung der Enzymaktivität unter Einfluß des Mediums bewirkt wird oder ob es durch die in den entsprechenden Zellen jeweils vorhandene Enzymmenge festgelegt ist.

Die Bakterien wurden dazu einmal in der logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte 0,5) und einmal in der stationären Phase (optische Dichte 1,2 bis 1,6) geerntet, zweimal mit 0,1 mol Phosphatpuffer pH 6,4 gewaschen und in dem gleichen Puffer mit 1 % Glucose inkubiert. Während der Gärung wurde laufend der pH-Wert überprüft und jeweils mit 0,1n NaOH auf den Ausgangs-pH-Wert zurücktitriert. Die Gärung wurde solange verfolgt, bis kein pH-Abfall mehr zu verzeichnen war.

1.1.2.1 *L.acidophilus* DSM 20242

Bei der Gärung der logarithmischen wie auch der stationären Zellen zeigte sich in Bezug auf die Bildung von D- bzw. L-Milchsäure etwa das gleiche Verhalten wie bei den im MRS-Medium wachsenden Zellen während der entsprechenden Wachstumsphasen. Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, wird sowohl bei im Medium wachsenden als auch bei im Puffer gärenden Zellen in beiden Wachstumsphasen immer mehr L- als D-Milchsäure gebildet. Auffallend ist außerdem, daß "ältere" Zellen (aus der stationären Wachstumsphase geerntet) sehr viel schneller sowohl D- als auch L-Milchsäure bildeten als junge Zellen. Dieses unterschiedliche Gärverhalten von "jüngeren" und "älteren" Zellen zeigte sich übrigens bei einer Reihe

ähnlicher Versuche, wobei Zellen aus einem späteren Entwicklungszustand immer schneller säuerten als Zellen aus einem früheren Stadium.



L = L-Milchsäure
D = D-Milchsäure

1 = logarithmische Zellen
2 = stationäre Zellen

Abb. 6:

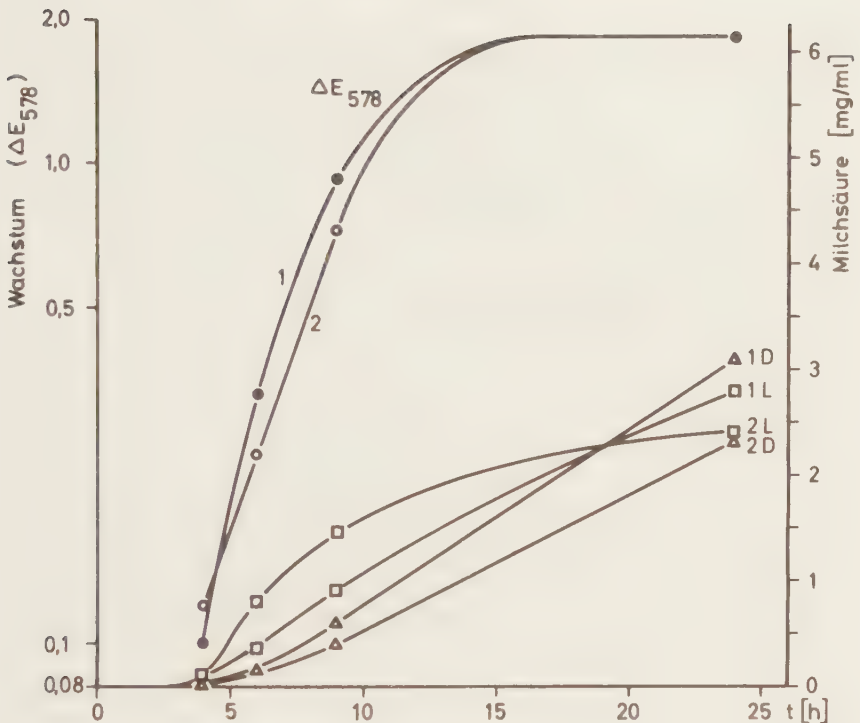
Glucosevergarung in Puffer mit logarithmischen und stationären Zellen von *L.acidophilus* DSM 26242.

1.1.2.2 L.acidophilus AM 63 Gasser

Ein entsprechendes Verhalten wurde für AM 63 festgestellt. Logarithmische Zellen bildeten bei der Gärung im Puffer bevorzugt L-Milchsäure, wie es auch bei den entsprechenden Zellen im Medium der Fall war. Bei den stationären Zellen wird dagegen im Puffer mehr D- als L-Milchsäure gebildet, wie es auch dem Verhalten der Zellen im Medium entsprach. Das D/L-Milchsäureverhältnis betrug für "junge" Zellen 0,6 und für "ältere" Zellen 2,4.

1.1.3 Wirkung von L-Lactat auf das Isomerenverhältnis während des Wachstums von DSM 20242

Zur Klärung der Frage, warum bei L.acidophilus DSM 20242 die Bildung der D-Milchsäure erst in der frühen stationären Wachstumsphase einsetzt, wurde geprüft, ob vielleicht analog zum Verhalten der Milchsäureracemase bei L.casei (Stetter und Kandler, 1973) erst nach einer bestimmten L-Milchsäurekonzentration im Medium die D-Lactat-Dehydrogenase induziert oder aktiviert wird und deshalb die D-Milchsäurebildung später beginnt. L.acidophilus DSM 20242 wurde dazu parallel in normales MRS-Medium und MRS-Medium mit 9,3 mg/ml L-Milchsäure geimpft. Das Wachstum wurde photometrisch gemessen und verlief, wie Abb. 7 zeigt, annähernd parallel zur Kontrolle ohne L-Milchsäure. Aus Abb. 7 geht ebenfalls hervor, daß in Gegenwart hoher L-Milchsäurekonzentrationen die D-Milchsäurekonzentrationen weder früher noch schneller als im Kontrollversuch anstieg. Die Bildung von D-Milchsäure konnte also nicht durch Zugabe hoher L-Milchsäurekonzentrationen induziert werden. Ebenso konnte man aus der Kurve auch keine Racemisierung erkennen.



1 = L-Lactat vorgelegt (9,32 mg/ml),
 2 = Kontrolle ohne vorgelegtes L-Lactat,
 L = L-Milchsäure, D = D-Milchsäure.

Abb. 7:

Versuch zur Induktion einer Lactatracemase durch L-Lactat bei *L. acidophilus* DSM 20242. (Die Werte geben die Zunahme an Milchsäure ohne Berücksichtigung der Menge an vorgelegtem L-Lactat an.)

1.2. Vergleich der spezifischen Aktivitäten der D- und L-Lactat-dehydrogenasen während des Wachstums

Auf Grund der oben beschriebenen Versuchsergebnisse wurde nun die Frage gestellt, ob das unterschiedliche Isomerenverhältnis während des Wachstums von *L. acidophilus* durch unterschiedliche Enzymmengen in den Zellen bestimmt wird, oder ob es sich um eine Regulation der Enzymaktivität handelt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Zellen jeweils in der logarithmischen und frühstationären Wachstumsphase geerntet, abzentrifugiert, zweimal mit 0,1 mol Phosphat-Puffer pH 7,5 gewaschen und mit der French-Press aufge-

schlossen. Der Extrakt wurde 30 min bei 50 000 g abzentrifugiert und der Überstand über Nacht zur Entfernung von NAD gegen 0,01 mol Phosphat-Puffer pH 7,5 dialysiert. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde der dialysierte Rohextrakt mithilfe des Standardtests mit D- und L-Milchsäure als Substrat untersucht.

1.2.1 L.acidophilus AM 63 Gasser

Tabelle 3 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Lactat-Dehydrogenasen von Zellen aus frühen und späten Wachstumsphasen. Bei den aus der logarithmischen Phase geernteten Zellen lag der Wert für die spezifische Aktivität der L-LDH 2,7 mal höher als für die D-LDH. Dieses Ergebnis stimmte mit dem D/L-Milchsäureverhältnis während des logarithmischen Wachstums im Medium überein, da in dieser Phase die Zellen nur etwa halb soviel D- wie L-Milchsäure gebildet hatten. Im Rohextrakt stationärer Zellen wurde eine geringere Aktivität der L-LDH festgestellt. Der Wert lag weniger als halb so hoch wie für die entsprechende D-LDH. Die spezifische Aktivität der L-LDH hatte offensichtlich mit dem Alter der Zellen abgenommen. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der beiden LDH entspricht also auch bei Zellen der stationären Wachstumsphase dem D/L-Milchsäureverhältnis einer stationär wachsenden Kultur im MRS-Medium. Entsprechend der höheren Rate der Bildung von D-Milchsäure im Medium ist auch die D-LDH im Rohextrakt stationärer Zellen aktiver.

Im Gegensatz zu den bisher getrennt durchgeführten Aktivitätsmessungen der D- und L-LDH mit Hilfe des Standardtests in nicht physiologischer Richtung (D- und L-Lactat als Substrat) kann man die beiden LDH-Aktivitäten mit Hilfe des Standardtests in physiologischer Richtung vom Pyruvat zum Lactat nur gemeinsam messen. Eine Bestimmung der vom Enzymgemisch von Zellen der stationären Wachstumsphase aus Pyruvat gebildeten Milchsäure ergab 27 % L- und 73 % D-Milchsäure. Die Aktivitäten der D- und L-LDH verhielten sich also in der nicht physiologischen

wie auch in der physiologischen Reaktionsrichtung ungefähr gleich.

1.2.2. L.acidophilus DSM 20242

Auch bei DSM 20242 wurden im Rohextrakt von Zellen verschiedener Entwicklungsstadien unterschiedliche spez. Aktivitäten der D- und L-LDH gemessen (Tab.3). Ähnlich wie bei AM 63 entsprachen die Aktivitäten der LDH dem D/L-Milchsäureverhältnis von Zellen früherer und späterer Wachstumsphasen im Medium. In der logarithmischen Wachstumsphase, in der die L-Milchsäurekonzentration um mehr als das Zehnfache höher lag als die D-Milchsäurekonzentration war auch die spezifische Aktivität der L-LDH im Rohextrakt der entsprechenden Zellen etwa viermal größer als die der D-LDH.

Im Rohextrakt von Zellen aus der späteren Wachstumsphase war der Wert für die L-LDH-Aktivität nur noch doppelt so hoch wie für die D-LDH. Der Wert der L-LDH-Aktivität von stationären Zellen war im Verhältnis zu dem der logarithmischen Zellen nur noch um etwa ein Drittel gestiegen, während bei der spez. Aktivität der D-LDH im Rohextrakt stationärer Zellen noch eine Steigerung um mehr als das Doppelte festzustellen war.

Der Test auf Bildung von D- und L-Milchsäure im dialysierten Rohextrakt stationärer Zellen bei Pyruvat als Substrat und NADH ergab entsprechend 26 % D- und 74 % L-Milchsäure.

1.3. Mn- und FDP-Aktivierbarkeit der D- und L-Lactat-Dehydrogenase bei L.acidophilus DSM 20242.

Zum Nachweis einer Mn- oder FDP-aktivierbaren LDH wurde der Standardtest mit Pyruvat als Substrat verwendet. Bei diesem Test ergab weder Mn noch FDP eine Steigerung der Aktivität der LDH im Rohextrakt.

Tabelle 3:
LDH-Aktivitäten im dialysierten Rohextrakt von Zellen aus früher und später Wachstumsphase.

Stamm	E (578 nm) bei Ernte	L-Lactat im Medium		L-LDH-Aktivität		D-Lactat im Medium		D-LDH-Aktivität	
		(mg/ml)	%	U/ml	U/mg Protein	(mg/ml)	%	U/ml	U/mg Protein
AM 63	0,21	0,271	62	7,818	10,424	0,168	38	3,000	4,000
	1,60	5,429	37	25,455	6,208	9,068	63	64,545	15,742
DSM 20242	0,46	1,511	92	11,818	6,388	0,125	8	2,909	1,572
	1,18	5,602	80	15,454	8,133	1,326	20	7,272	3,827

1.4 Diskussion der Ergebnisse zur Frage des Isomerenverhältnisses

Nach Garvie (1967) wird bei *L.acidophilus* NCD02 das Isomerenverhältnis während des Wachstums durch das Alter der Kultur und den pH des Mediums, aus denen die Zellen geerntet werden, beeinflusst. Während bei diesem Stamm zu Beginn des Wachstums die L-Lactat-Konzentration sehr schnell ansteigt, ist der prozentuale Anteil an L-Milchsäure am Ende des Wachstums geringer. Durch Konstanthaltung des pH in Medium auf 6-6,7 erreichte sie, daß dieser Stamm vorwiegend L-Lactat produzierte und sie schloß daraus die pH-Abhängigkeit. Zusätzliche Versuche bei verschiedenen Inkubationstemperaturen zeigten auch eine Bevorzugung der L-Milchsäureproduktion bei 37°C.

Den gleichen Verlauf des Isomerenverhältnisses während des Wachstums fanden auch Gordon und Doelle (1975) bei ihren Untersuchungen an *Pediococcen*. Ebensowenig wie bei *L.acidophilus* konnten sie für diese Gattung eine Racemase nachweisen und vermuteten, daß auch in diesem Fall der pH des Mediums einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat, da die D-LDH bei *Pediococcen* ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von ca. 3,6 hat, während man für die L-LDH ein Optimum bei 5-5,6 beobachtete.

In unseren Untersuchungen bei einer Reihe von Vertretern von *L.acidophilus* fanden wir, wie die Tabelle 2 zeigt, daß das Verhältnis der Isomerenproduktion bei verschiedenen Stämmen sehr unterschiedlich ist und somit die Folgerung der beiden Autoren, daß die D-Lactat-Produktion vom pH des Mediums während des Wachstums abhängt, zumindest nicht allgemein zutreffen kann.

Eine induzierbare Racemase konnte von uns ebenso wie von Garvie (1967) und Gordon et al. (1975) ausgeschlossen werden, denn die Vorlage von L-Lactat im Medium führte nicht zu früherer D-Lactatbildung.

Die Möglichkeit, daß die später einsetzende Produktion eines Isomers durch Veränderung des Mediums während des Wachstums

und eine damit verbundene direkte regulierende Wirkung auf die Aktivität der Enzyme durch Außenfaktoren wie z.B. pH oder Verarmung an Spurenelementen beeinflusst wird, konnten wir an Hand von Gärungsversuchen mit Zellen verschiedener Wachstumsphasen im Puffer mit Glucose als Substrat ebenfalls ausschließen. Es entstand bei der Gärung im Puffer immer das dem bei wachsenden Zellen im Medium entsprechende Isomerenverhältnis.

Es blieb also nur noch die Frage offen, ob das unterschiedliche Isomerenverhältnis im Verlaufe des Wachstums von der jeweiligen LDH-Menge in den verschieden alten Zellen abhängt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Enzymaktivität im Rohextrakt von Zellen verschiedener Wachstumsphasen geprüft. Dabei wurden die optimalen Reaktionsbedingungen gewählt, sodaß die Enzymaktivität als Maß für die Enzymmenge angenommen werden konnte. Die entsprechenden Versuche zeigten, daß sich das Verhältnis der Enzymaktivitäten und unter der vorher erwähnten Voraussetzung auch die Enzymmenge der beiden Formen der LDH im gleichen Sinne wie das Isomerenverhältnis verändern. Während in der logarithmischen Phase die L-LDH dominiert, nimmt die D-LDH erst im Verlauf des Wachstums zu. Es handelt sich also um eine sequentielle Genaktivierung oder um eine verstärkte Translation im Entwicklungsablauf, was noch durch weitere Versuche überprüft werden muß.

2. Wachstumstemperatur

Das Unvermögen bei 15°C zu wachsen ist ein klassisches Unterscheidungsmerkmal der Thermobakterien von den Streptobakterien.

Zur Überprüfung dieses Kriteriums wurden die Stämme bei 15°C und 40°C bebrütet, wobei darauf geachtet wurde, daß die Animpfungsmenge sehr gering gehalten wurde. Keiner der untersuchten Stämme zeigte bei 15°C Wachstum, während bei 40°C alle Stämme wuchsen.

3. Zuckerverwertungsspektren

Die Verwertbarkeit bestimmter Zucker ist ein klassisches Merkmal für die Klassifizierung von Lactobacillen. Zur Bestimmung des Zuckerverwertungsspektrums der Vertreter von *L.acidophilus* wurden folgende Zucker verwendet: Mannit, Ribose, Arabinose, Xylose, Sorbit, Raffinose, Melibiose, Rhamnose, Saccharose, Maltose, Trehalose, Lactose, Cellobiose, Salicin, Inulin. Davon wurden Ribose, Arabinose, Xylose, Rhamnose und Sorbit in Übereinstimmung mit Reuter und Mitsuoka nicht vergoren und sind deshalb in der Tabelle 3 nicht mehr aufgeführt.

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Verwertungsspektren verschiedener Stämme. Auf Grund der Zahl der abgebauten Zucker wurden die Stämme in 9 Gruppen eingeteilt (a-h), wobei die Vertreter der Gruppe a zwei Zucker, die Vertreter der Gruppe b drei Zucker usw. verwerten konnten. Innerhalb dieser Gruppen wurden dann noch die Stämme zusammengefaßt, die ein gleiches Zuckerverwertungsspektrum aufwiesen (z.B. d1). Bei den Gruppen a, b, g und h trat nur eine Merkmalskombination auf, während bei den Gruppen c, d, e und f je drei Untergruppen gefunden wurden.

Auf der linken Seite der Tabelle ist die ursprüngliche von den Autoren vorgenommene Zuordnung der einzelnen Stämme zu den jeweiligen Gruppen bzw. Typen von Reuter und Mitsuoka angegeben. Die Spalten ganz rechts enthalten die Zuordnung auf Grund der von uns bestimmten Merkmale. Der Vergleich zeigt, daß sich Unterschiede zu den von den Autoren bestimmten Zuckerverwertungsspektren zeigen, wobei die Änderungen nicht sehr drastisch waren und jeweils nur auf dem Unterschied bei einem Zucker beruhten. So waren F 177a und F 169a, Vertreter der Gruppe II bei Reuter im Gegensatz zu seinen Untersuchungen bei uns Raffinose positiv. XXIX JR und B 39/4b bei Reuter in Gruppe II vergoren bei uns im Gegensatz zu seinen Untersuchungen keine Melibiose und entsprechen demnach

Übersicht über die Vergärbarkeit verschiedener Kohlehydrate durch die einzelnen Stämme.
(+ = vergärbar; - = nicht vergärbar)

Ursprüngliche Zuordnung		Merkmalskomb.	Stammbezeichnung	DD-Carboxypeptidase	L-LDH	D-LDH	Mann	Raff	Meli	Sac	Mal	Treh	Lac	Cello	Sali	Inu	Neue Zuordnung nach den erneut bestimmten Merkmalen			
Reuter	Mits.																Reuter	Mits.		
		a	a1 SA 9	+	III	2	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-				
		b	b1 SA 24		I	1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-				
	IX IX	c	c1 CHN 22-1-10	-	I	2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-		IX		
	c1 CHN-J-1-6		-	I	2															
	VIII	c2 T-91	+	II	1	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-		VIII			
	Va	c3 I-69-7	-	I	3	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-		Va			
I I II	II	d	d1 DSM 20077	-	I	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-			
			d1 DSM 20079	+	III	2														
			d1 F 164	-	I	1													I	
			d1 VII JS	-	I	3														
			d1 F 177a	-	I	3														
			d1 Sc	-	I	1														
			d1 I-36-7	-	I	3													I	
			d2 SA 12	+	II	1	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-		
Vb	d3 PNI-9	+	II	3	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-		Vb		
I II		e	e1 AM 63	-	I	3			-	+	+	+	+	+	+	-				
			e1 538	-	I	3	-	-	-											
			e1 69 K	-	I	1														
			e1 XXIV JR	-	I	3													I	
II III III			e1 F 169a	-	I	3														
			e2 D 4	-	I	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-			
			e2 Omniflora	-	I	1				+	+		+	+	+	-	-		II	
			e2 XXIX JR	+	II	3														
	IVb VIa		e2 B-39/4b	+	III	1														
			e3 PNRI-2-3	+	II	3	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-			IVb
			e3 Kd 16-3	+	II	3												IV		
IV		f	f1 ATCC 9857	+	III	3	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-			
			f1 D 3	-	I	1														
			f1 R I	+	II	1													II	
			f1 SA 16	+	III	2														
II III	II II		f2 H 18b	-	I	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-			
			f2 Sp 34	+	II	1													III	
			f2 PNRI-2-4	-	I	3														II
			f2 CHNI-2-7	-	I	3														
IV	IVa IVb VIb VIb VII		f3 ATCC 314	+	III	1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-			
			f3 A 244-1	+	III	2														
			f3 34-26	-	I	2														
			f3 CHNI-4	+	II	1														
			f3 T-50	+	II	3														
			f3 CHN4-2-5	+	II	3														
			f3 SA 13	+	II	1														IVa
III	IIIa	g	g1 H 27a	+	I	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-			III	
			g1 A 201-7	+	II	3														III
	X	h	h1 A 263-19	+	II	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+			X	

mehr den Vertretern der Gruppe II. Entsprechend der Vertreter der Gruppe III bei Reuter sollten Vertreter des Typs VIa bei Mitsuoka auch Melibiose verwerten können. Kd-16-3 erwies sich in unseren Untersuchungen als Melibiose negativ und entspricht somit mehr dem Typ IVb von Mitsuoka. H18b dagegen, bei Reuter in Gruppe II zu finden, vergor die Melibiose und entspricht damit mehr der Gruppe III. RI ein Vertreter der Gruppe IV bei Reuter sollte im Gegensatz zu unseren Untersuchungen keine Trehalose verwerten können.

Wie die Tabelle zeigt, wurden Raffinose, Saccharose, Maltose, Trehalose und Lactose von den meisten der untersuchten Stämme als Energiequelle verwendet. Lerche und Reuter sowie Rogosa und Sharpe gaben als Unterscheidungsmerkmal für *L.acidophilus* und *L.salivarius* die Vergärbarkeit von Mannit und Cellobiose an, wobei *L.acidophilus* immer Mannit-negativ und Cellobiose-positiv sein sollte. Dieses Verhalten gegenüber Mannit konnte bei den hier untersuchten Stämmen mit nur einer Ausnahme bestätigt werden. Solche Ausnahmen beschreibt auch Mitsuoka. Auch für die Vergärung von Cellobiose traf die Annahme von Reuter mit nur zwei Ausnahmen zu. Während nach Reuter und Mitsuoka alle Stämme von *L.acidophilus* Salicin verwerten können, wurde dieses Glycosid bei uns nur etwa von der Hälfte der untersuchten Stämme vergoren. Gegenüber Melibiose verhielten sich die Vertreter der vier verschiedenen Gruppen von Reuter meist negativ (Ausnahme Gruppe III) während die Stämme von Mitsuoka meist diesen Zucker verwerten konnten. In unseren Untersuchungen fanden wir, daß mehr als die Hälfte der untersuchten Stämme von *L.acidophilus* Melibiose nicht abbauen konnten.

An Hand der Zuckerverwertungsspektren konnte gezeigt werden, daß innerhalb der Art der *L.acidophilus* eine große Kombinationsvielfalt besteht. Nach den Regeln der Kombinationsrechnung ergeben sich bei einer Anzahl n verschiedener Elemente $\binom{n}{k}$ verschiedene Kombinationen, wobei k die Anzahl der jeweils kombinierten Elemente darstellt. Werden zum Beispiel von 9 Zuckern drei verwertet, so ergeben sich $\binom{9}{3} = \frac{9 \times 8 \times 7}{1 \times 2 \times 3} = 84$ ver-

schiedene Möglichkeiten. Für $k = 1-9$ ergeben sich somit theoretisch insgesamt 511 verschiedene Merkmalskombinationen.

Die 44 untersuchten Stämme verteilen sich bei den in der Tabelle 3 aufgeführten 10 Zuckern auf 16 verschiedene Merkmalskombinationen, wobei Häufungen bis zu 7 Stämmen pro Merkmalskombination auftreten. Da viele Stämme dasselbe Zuckervergärungsspektrum haben, müßten einige tausend Vertreter von *L.acidophilus* untersucht werden, um jede Kombination einmal zu finden. Die folgende Betrachtung, die sich der Übersichtlichkeit halber auf nur 5 Zucker beschränkt, soll die Zusammenhänge noch einmal verdeutlichen.

Entsprechend der oben genannten Formel über die Anzahl der möglichen Kombinationen ergeben sich bei 5 verschiedenen Zuckern mit $n = 5$ und $k = 0, \dots, 5$ insgesamt 32 verschiedene Möglichkeiten. Dabei ist mit $k = 0$ auch der Fall erfaßt, daß keiner der angebotenen Zucker verwertet wird. Es soll nun der Versuch einer Aussage darüber gemacht werden, wieviele Stämme untersucht werden müßten, um jede Kombination einmal zu finden.

Geht man zunächst einmal von der rein hypothetischen Voraussetzung aus, daß es für keine der möglichen Kombinationen einen Vorzug gibt, d.h. alle Kombinationen gleich häufig vorkommen, so ist bei einem willkürlich gewählten Stamm die Wahrscheinlichkeit p , daß eine bestimmte Kombination auftritt,

$$p = \frac{1}{32} = 0,03125.$$

Mit der Wahrscheinlichkeit p bei einem einzelnen Stamm ergibt sich bei m untersuchten, willkürlich gewählten Stämmen die Wahrscheinlichkeit P für eine bestimmte Kombination nach der Bernoulli- oder Binominalverteilung :

$$P = 1 - q^m \quad \text{mit} \quad q = 1 - p$$

$$\text{da } p = \frac{1}{32} \text{ ist } q = 1 - \frac{1}{32} = \frac{31}{32} = 0,96875$$

$$\text{oder } P = 1 - \left(\frac{31}{32}\right)^m$$

m	P	
1	0,03125	Wenn entsprechend der Voraussetzung für keine Kombination ein Vorzug besteht, ist P auch gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit dafür, daß bei m untersuchten Stämmen jede Kombination mindestens einmal vorkommt. Die nebenstehende Tabelle gibt den zahlenmäßigen Zusammenhang zwischen m und P wieder. Man sieht, daß sich erst bei mehr als 150 untersuchten Stämmen eine Wahrscheinlichkeit von 99 % ergibt (zum Vergleich: Für dieselbe Wahrscheinlichkeit wären bei 500 Kombinationen etwa 2500 Stämme zu untersuchen).
2	0,0615	
5	0,147	
10	0,272	
20	0,47	
30	0,614	
40	0,72	
44	0,75	
60	0,85	
80	0,921	
100	0,958	
150	0,991	
200	0,9982	
300	0,99993	
∞	1,0	

Die Tabelle 5 gibt einen Überblick darüber, inwieweit die oben erwähnte Voraussetzung zulässig war. Es muß allerdings betont werden, daß das vorliegende Material (44 untersuchte Stämme) für eine statistische Untersuchung viel zu gering ist, um gesicherte Aussagen zu machen. Gewisse Tendenzen sind allerdings zu erkennen.

In der ersten Spalte sind die insgesamt möglichen 32 Kombinationen aufgeführt, die in den folgenden Spalten zu Gruppen mit gleicher Anzahl an verwerteten Zuckern zusammengefaßt sind. Die absolute Häufigkeit der einzelnen Kombinationen ist recht unterschiedlich. Viele kommen überhaupt nicht vor, während Nr. 14 gleich achtmal auftritt. Insgesamt kommen nur 12 Möglichkeiten vor. Der Vergleich von Spalte 4 (Summe der in einer Gruppe verwirklichten Kombinationen) und Spalte 5 schließlich zeigt, daß bestimmte Kombinationen doch bevorzugt auftreten, und zwar besonders deutlich in der Gruppe mit 4 verwerteten Zuckern ($k = 4$). Hier finden sich etwa doppelt so viele Vertreter wie

Tabelle 5:

Statistische Betrachtung der vorkommenden Merkmalskombinationen bei Berücksichtigung der Verwertung 5 verschiedener Zucker.

Sp.	1					eigene Stämme						Stämme von Weiß			
						3	4	5	6	7	8	3*	4*	6*	7*
Nr.	mögliche Kombination					absolute Häufigkeit (verwirklichte Komb.)	Summe der vorkommenden Komb. in einer Gruppe	bei Gleichrangigkeit hätten auftreten müssen	relative Häufigkeit (Einzelhäufigkeit)	relative Häufigkeit der Gruppe	Wahrscheinlichkeit für das Auftreten in einer Gruppe bei Gleichran- gigkeit der Kombinat.	absolute Häufigkeit (verwirklichte Komb.)	Summe der vorkommenden Komb. in einer Gruppe	relative Häufigkeit (Einzelhäufigkeit)	relative Häufigkeit der Gruppe
	Reff	Meli	Treh	Cello	Sali	k									
1	-	-	-	-	-	0	1	1	1	0,0227	0,0227	0,03125	0	0	0
2	+	-	-	-	-		0								
3	-	+	-	-	-		0								
4	-	-	+	-	-	1	0	3	1	0,0682	0,15625	0	0		0
5	-	-	-	+	-		0								
6	-	-	-	-	+		3			0,0682		0		0	
7	+	+	-	-	-		0					0		0	
8	+	-	+	-	-		0					0		0	
9	+	-	-	+	-		2			0,0455		0		0	
10	+	-	-	-	+		0					0		0	
11	-	+	+	-	-	2	0					0		0	
12	-	+	-	+	-		0	11	14	0,25	0,3125	0	11	0	0,093
13	-	+	-	-	+		0					0		0	
14	-	-	+	+	-		8			0,182		5		0,0423	
15	-	-	+	-	+		0					0		0	
16	-	-	-	+	-		1			0,0227		6		0,0508	
17	+	+	+	-	-		0					0		0	
18	+	+	-	+	-		0					0		0	
19	+	+	-	-	+		0					0		0	
20	+	-	+	+	-		4			0,091		0		0	
21	+	-	+	-	+		0					0		0	
22	+	-	-	+	+	3	2	11	14	0,0455	0,25	0,3125	13	76	0,11
23	-	+	+	+	-		0					0		0	0,644
24	-	+	+	-	+		0					0		0	
25	-	+	-	+	+		0					0		0	
26	-	-	+	+	+		5			0,1136		63		0,534	
27	+	+	+	+	-		4			0,091		0		0	
28	+	+	+	-	+		0					0		0	
29	+	+	-	+	+	4	7	15	7	0,159	0,341	0,1562	10	12	0,0847
30	+	-	+	+	+		4			0,091			2		0,0169
31	-	+	+	+	+		0					0		0	
32	+	+	+	+	+	5	3	3	1	0,0682	0,0682	0,03125	19	19	0,161
Σ						44	44			1,0	1,0	118	118	1,0	1,0

bei Gleichrangigkeit jeder Kombination zu erwarten war. Auch in den Gruppen mit $k = 0,1$ und 5 ergeben sich Unterschiede, die auf Grund der kleinen Zahlen allerdings nicht sehr hoch bewertet werden dürfen. In den Gruppen mit $k = 2$ und 3 wurde etwa die zu erwartende Zahl erreicht.

Die Spalte 6 zeigt ebenfalls, daß sich die relativen Häufigkeiten von der Einzelwahrscheinlichkeit $p = 0,03125$ oft erheblich unterscheiden, und der Vergleich der Spalte 7 und 8 entspricht noch einmal dem Vergleich von Spalte 4 und 5, wobei sich die relativen Häufigkeiten und Wahrscheinlichkeiten auf die Gruppen mit gleicher Zuckerzahl beziehen.

Wurden bei den untersuchten 44 Stämmen immerhin noch 12 verschiedene Kombinationen gefunden, so ist die Kombinationszahl bei 118 von Weiß (1967) untersuchten Stämmen von *L.acidophilus* noch viel geringer. Wie aus den entsprechend berechneten Werten in den Spalten 3*, 4* und 7* hervorgeht, ergaben sich nur 7 verschiedene Kombinationen mit einer deutlichen Häufung von Kombinationen Nr. 26 (63 Stämme). Dies mag darauf beruhen, daß die von Weiß untersuchten Stämme praktisch nur aus den Faeces von Menschen stammten, während unser Material auch Isolate von Tieren umfaßt. Dies zeigt noch deutlicher, daß die einzelnen Kombinationen auch nicht annähernd gleich häufig auftreten, woraus folgt, daß die ursprüngliche Annahme von der Gleichrangigkeit aller Kombinationen nicht zutrifft und somit auch die Berechnung von Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer bestimmten Kombination unmöglich wird. Ebensowenig können auf Grund des vorliegenden Materials Aussagen darüber gemacht werden, wieviele Stämme untersucht werden müßten, um jede Kombination einmal zu finden. Ja es erscheint sogar sehr wahrscheinlich, daß gar nicht alle Kombinationen innerhalb der Art *L.acidophilus* auftreten können. Es ist jedoch mit Sicherheit anzunehmen, daß bei Vergrößerung des Untersuchungsmaterials noch mehr Kombinationen gefunden werden können.

B. Neuere biochemische Merkmale

1. Elektrophoretische Beweglichkeit der Lactatdehydrogenasen

Die Art der bei Lactobacillen jeweils vorliegenden LDH, sowie deren elektrophoretische Beweglichkeit ist nach Gasser (1970) in der Regel innerhalb einer Art konstant. Eine Ausnahme bildet *L.acidophilus*, dessen Vertreter unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit ihrer LDH auf dem Polyacrylamidgel zeigten, was ebenfalls für die Heterogenität dieser Art spricht.

1.1 Vergleich der NAD-abhängigen D- und L-Lactatdehydrogenasen

Gasser (1970) fand bei seinen Untersuchungen an *L.acidophilus* jeweils drei nach ihrer Wanderstrecke unterschiedliche NAD-abhängige D- und L-LDH. Auf der Basis der L-LDH ergaben sich drei Gruppen von *L.acidophilus*, bei denen in zwei Gruppen jeweils nur eine Art von D-LDH in Kombination mit der jeweiligen L-LDH auftrat, in einer dritten Gruppe (Gruppe II) aber zwei verschiedene D-LDH gemeinsam mit der dritten Form der L-LDH vorkamen.

Die vorliegenden Untersuchungen, bei denen Rohextrakte von 44 verschiedenen Stämmen von *L.acidophilus* mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht und die Wanderstrecke der D- und L-LDH bestimmt wurden, zeigten wie bei Gasser drei verschiedene L-LDH-Gruppen. Dabei ergaben sich allerdings im Gegensatz zu Gasser innerhalb aller drei L-LDH-Gruppen verschiedene Formen der D-LDH. Wie die Tabelle 6 zeigt, weist die Gruppe I eine sehr kurz wandernde L-LDH auf, die mit drei verschiedenen D-LDH-Typen kombiniert sein kann. Bei der Gruppe II mit einer weiter laufenden L-LDH kommen zwei der insgesamt drei gefundenen D-LDH-Typen vor (1 und 3). Dies gilt auch für die dritte Gruppe (III) mit der am weitesten wandernden L-LDH (1 und 2).

Wie die Tabelle 6 zeigt, ergibt sich für die einzelnen Gruppen eine Fehlerbreite von 0,05 bis 0,10 bei den Wanderstrecken.

Tabelle 6:

Die elektrophoretischen Laufstrecken der LDH

(Wanderstrecke der Kaninchen-LDH-Iso I = 1,0)

Stamm	NAD-abhängige LDH				NAD-unabhängige LDH					
	L-LDH	Typ	D-LDH	Typ	L-LDH		D-LDH			
					Vor- kom- men	relative Wander- strecke	Vor- kom- men	relative Wander- strecke		
DSM 20077 D 3 D 4 Omniflora F 164 Sc 69 K SA 24	0,95 $\pm$ 0,05	I	1,35 $\pm$ 0,10	1	+	0,75 $\pm$ 0,05	+	0,75 $\pm$ 0,05		
34-26			1,50 $\pm$ 0,05	2	+	0,75 $\pm$ 0,05	+	0,60 $\pm$ 0,05		
CHN-J-1-6					+		+			
CHN-22-1-10					+		+			
F 177a					+		+			
PNR-I-2-4					1,20 $\pm$ 0,05	3	+	0,75 $\pm$ 0,05	+	0,68 $\pm$ 0,05
CHN-1-2-7							+		-	
I-36-I							+		+	
H 18b							+		-	
AM 63							+		-	
F 169a							+		+	
VII JS							+		-	
XXV JR					+		-			
H 27 a					-		-			
538					+		-			
I-69-7					+		-			
SA 12 Sp 34 RI CHN-I-4 A 263-19 T 91 SA 13	1,11 $\pm$ 0,05	II	1,35 $\pm$ 0,10	1	+	0,45 $\pm$ 0,05	+	0,95 $\pm$ 0,05		
XXIV J			1,20 $\pm$ 0,05	3	+	0,45 $\pm$ 0,05	+	0,68 $\pm$ 0,05		
A 201-7					+		+			
PN1-9					+		-			
T 50					+		-			
PNR-I 2-3					+		-			
CHN-4-2-5					+		-			
Kd 16-3					+		-			
ATCC 314 B 39/4b			1,29 $\pm$ 0,10	III	1,35 $\pm$ 0,10	1	-		-	
DSM 20079					1,50 $\pm$ 0,05	2	-		-	
ATCC 9857							-		-	
A 244-1							-		-	
SA 9					-		-			
SA 16					-		-			

Zur Überprüfung der Zugehörigkeit wurde deshalb in jeder Gruppe ein Stamm als Standard bestimmt und damit Koelektrophoresen mit den restlichen Vertretern der Gruppe durchgeführt.

1.2 NAD-unabhängige D- und L-LDH

Neben den Banden für die NAD-abhängigen D- und L-LDH konnte nach der Entwicklung mit D- bzw. L-Lactat bei vielen Stämmen auch NAD-unabhängige LDH gefunden werden, wie auch Gasser allerdings nur bei einer geringen Anzahl von Stämmen feststellte. Die Aktivitäten waren jedoch meistens relativ gering und erst bei Verwendung von unverdünnten Rohextrakten waren die Banden gut sichtbar.

Die NAD-unabhängigen LDH wurden in zusätzlichen Koelektrophoresen miteinander verglichen. Dabei ergaben sich für die L-LDH Gruppen 2 verschiedene NAD-unabhängige L-LDH, die sehr gut mit den einzelnen Formen der L-LDH korrelierten. Für den L-LDH-Typ I wurden mit zwei Ausnahmen die keine NAD-unabhängige L-LDH aufwiesen nur eine Form der NAD-unabhängigen L-LDH gefunden mit einer Wanderstrecke von $0,75 \pm 0,05$, für den Typ II mit einer Ausnahme ebenfalls nur eine mit einer Wanderstrecke von $0,45 \pm 0,05$ und für den Typ III keine.

Für die D-LDH fanden wir 4 verschiedene NAD-unabhängige D-LDH, wobei aber eine eingeschränkte Parallelität mit der entsprechenden NAD-abhängigen festzustellen war. Die D-LDH vom Typ 1 war entweder mit zwei verschiedenen NAD-unabhängigen D-LDH, die Wanderstrecken von $0,75 \pm 0,05$ und $0,95 \pm 0,05$ aufwiesen, oder bei etwa 50 % der Fälle mit keiner NAD-unabhängigen D-LDH kombiniert. Beim Typ 2 tauchten entweder NAD-unabhängige D-LDH mit einer Wanderstrecke von $0,60 \pm 0,05$ oder gar keine auf. Beim D-LDH-Typ 3 tauchten bei 30 % der Fälle NAD-unabhängige D-LDH mit einer Wanderstrecke von $0,68 \pm 0,05$ auf, bei den übrigen D-LDH konnten keine NAD-unabhängige D-LDH gefunden werden.

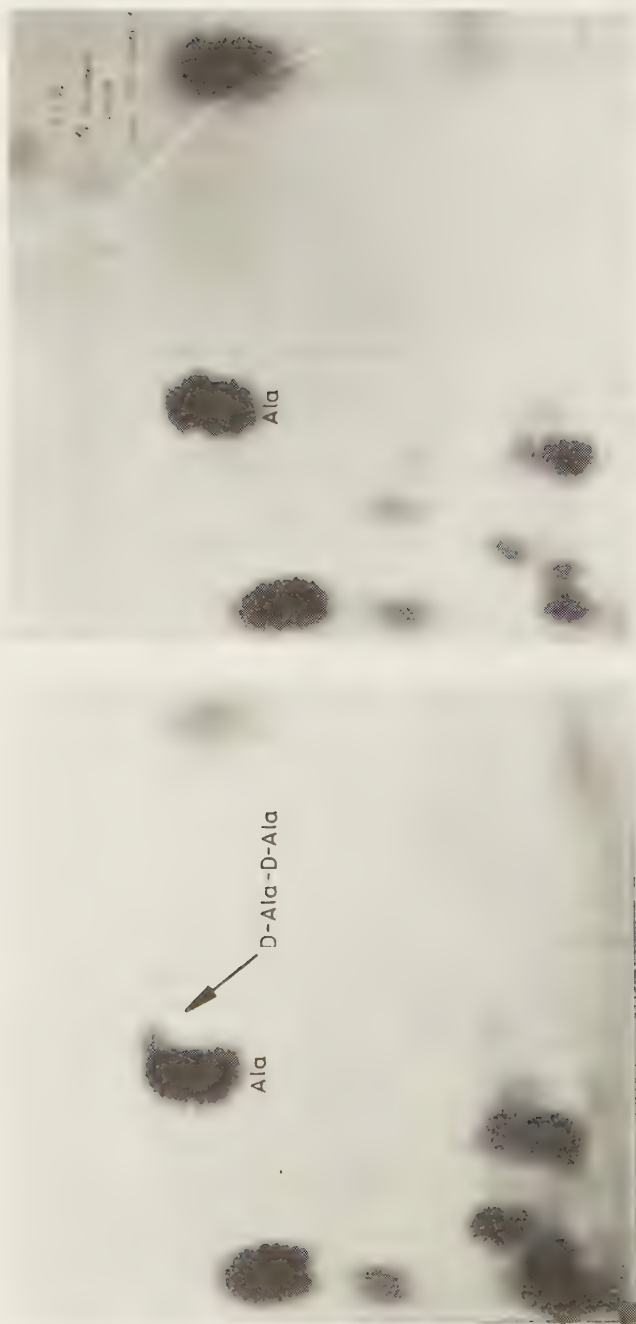
2. Zellwandzusammensetzung

2.1. Murein

Alle Thermobakterien weisen in ihrem Peptidoglycan den Lys-Asp-Typ auf (Kandler 1967, 1970). Während Weiß (1967) bei den Zellwandpräparationen seiner *L.acidophilus* Stämme einen molaren Anteil an Alanin von 1,5 - 1,8 fand, erhielten Coyette und Ghuysen (1970) bei *L.acidophilus* AM 63 einen Wert über 2. Mit Hilfe einer Carboxypeptidase, welche das terminale D-Ala freisetzt, konnte er nachweisen, daß bei diesem Stamm der D-Ala-D-Ala-Rest am Ende zahlreicher Peptiduntereinheiten des Peptidoglycans erhalten bleibt.

Von allen 44 hier untersuchten Stämmen wurden daher die Zellwände isoliert und mit Hilfe des Beckman-Aminosäureanalysators das Mol-Verhältnis von Glutaminsäure zu Alanin bestimmt.

Die Ergebnisse in Tabelle 8 zeigen, daß ein Teil der Stämme einen molaren Anteil an Alanin von 1,42 - 1,84, ein anderer Teil aber von über 2 aufweist. Die chromatographische Analyse der Partialhydrolysate von Zellwänden mit einem hohen molaren Anteil an Alanin (über 2) zeigt, daß D-Ala-D-Ala auftritt, das in Partialhydrolysaten von Zellwänden mit geringem Alaninanteil fehlt (Abb. 8). Dies stimmt mit der Annahme überein, daß sich die beiden Gruppen von Stämmen durch den Besitz bzw. das Fehlen der Carboxypeptidase unterscheiden. Ist dieses Enzym vorhanden, so wird das terminale D-Alanin abgespalten und es könnte zu einer Verminderung der Quervernetzung der Peptiduntereinheiten im Peptidoglycan kommen, wenn diese Abspaltung in Konkurrenz zur Transpeptidierung steht. Wir vermuteten deshalb, daß Stämme mit einem molaren Anteil von Alanin von 1,5 - 1,8 einen geringeren Quervernetzungsgrad des Mureins aufweisen als die Vertreter der 2. Gruppe, deren molarer Anteil an Alanin über 2 lag.



L.acidophilus AM 63 Gasser
(3 mg/50 min/4n HCl)
Mol Ala/Mol Glu = 2,32

L.acidophilus DSM 20079
(3 mg/50 min/4n HCl)
Mol Ala/Mol Glu = 1,54

Abb.8:

Chromatogramme von Partialhydrolysaten von Vertretern der
beiden Gruppen I und II.

Zur Klärung dieser Frage wurde bei Vertretern beider Gruppen durch Dinitrophenylierung der Zellwände der Gehalt an N-terminalen Lysin- und Asparaginsäureresten bestimmt und daraus der Quervernetzungsgrad errechnet.

Tabelle 7 zeigt, daß im Hydrolysat der DNP-Zellwand der beiden Vertreter der Gruppe 1 (ohne Carboxypeptidase) rund 0,4 Mol Asparaginsäure/Mol Glutaminsäure und bei den beiden Stämmen der Gruppe 2 (mit Carboxypeptidase) 0,3 Mol Asparaginsäure/Mol Glutaminsäure weniger enthalten sind, als bei der nicht dinitrophenylierten Zellwand. Dies zeigt das Vorkommen entsprechender Mengen an N-terminaler Asparaginsäure. Die Quervernetzungsrate ist demnach bei Gruppe I mit rund 60 % geringer als bei Gruppe II mit 70 %. Dieser Befund widerspricht der oben angeführten Erwartung und zeigt, daß die Carboxypeptidase in diesem Fall offenbar nicht die vermutete Bedeutung für das Ausmaß der Quervernetzung hat.

Bei der Berechnung der Quervernetzung wurde außer Acht gelassen, daß nicht nur die Mengen an Asparaginsäure sondern auch die an Lysin im Hydrolysat der DNP-Zellwand geringer ist als in der Kontrolle, was ebenfalls auf das Vorkommen einer signifikanten Menge an N-terminalem Lysin schließen ließe. Da aber in der nicht-dinitrophenylierten Zellwand das Molverhältnis Asparaginsäure/Lysin praktisch 1:1 ist, ist das Vorliegen einer signifikanten Menge an N-terminalen Lysin höchst unwahrscheinlich. Die Abnahme von freiem Lysin um 0,1 Mol/Mol Glutaminsäure nach Dinitrophenylierung beruht wahrscheinlich auf der höheren Stabilität des dinitrophenylierten Amino-Succinyl-Lysins, das bei der Hydrolyse aus dem Peptid Amino-Aspartyl-Lysin entsteht, gegenüber der freien Verbindung, die bei der gewählten verschärften Hydrolysebedingung (6N HCl, 120°C, 18^h) praktisch vollständig hydrolysiert wird.

Tabelle 7:

Molare Verhältnisse der Aminosäuren unbehandelter und dinitrophenylierter Zellwände.

Gruppe	Stamm	Asparaginsäure Mol/Mol Glu	Lysin Mol/Mol Glu
I	AM 63 a	0,93	0,86
	AM 63 b ₁	0,55	0,87
	AM 63 b ₂	0,56	0,85
	I-69-7 a	0,97	0,95
	I-69-7 b ₁	0,58	0,88
	I-69-7 b ₂	0,57	0,86
II	ATCC 9857 a	0,95	0,95
	ATCC 9857 b ₁	0,63	0,86
	ATCC 9857 b ₂	0,63	0,84
	A 201-7 a	0,98	0,99
	A 201-7 b ₁	0,63	0,83
	A 201-7 b ₂	0,64	0,83

I = DD-Carboxypeptidase negativ

II = DD-Carboxypeptidase positiv

a = Kontrolle

b₁ und b₂ = DNP-Proben

2.2 Zellwandzucker

Bei ihren Untersuchungen an AM 63 fanden Coyette und Ghuysen (1970), daß das neutrale Polysaccharid in der Zellwand dieses Stammes aus äquimolaren Mengen Glucose, Galactose und Rhamnose besteht. Sowohl unsere papierchromatographischen als auch unsere gaschromatographischen Untersuchungen bei AM 63 bestätigten diesen Befund in qualitativer Hinsicht. Wie die Tabelle 8 zeigt, schwankt der Gesamtzuckergehalt bei den 44 untersuchten Stämmen von *L.acidophilus* sehr stark von etwa 40 % bis zu einem praktisch völligen Fehlen (höchstens 1 %). Im allgemeinen dominiert die Glucose, manche Stämme weisen aber auch nur geringe Mengen von weniger als 0,05 μM auf. Die Galactose fehlt bei einigen Vertretern, die nur Spuren von Glucose aufweisen (rund 1%), vollständig, erscheint aber in einigen Fällen wo auch erhebliche Mengen an Glucose auftreten. In wenigen Ausnahmen übersteigt sie sogar die Menge an Glucose. Der molare Anteil an Rhamnose war in der Regel sehr gering. Wie die Tabelle 8 zeigt, unterschieden sich die Stämme in der Kombination der drei Zucker. Alle Stämme wiesen in ihrer Zellwand Glucose auf, die meisten mit Ausnahme von fünf Vertretern besaßen auch Galactose. Rhamnose fehlte dagegen bei der Mehrzahl der untersuchten Stämme. Das Vorhandensein von Rhamnose in der Zellwand einzelner Vertreter war stets mit dem Vorhandensein von Glucose und Galactose kombiniert. Zwischen dem Gehalt an Zuckern in der Zellwand und der An- bzw. Abwesenheit von Carboxypeptidase ergab sich eine gewisse Parallelität. Bei teichonsäurehaltigen Zellwänden waren generell weniger Kohlehydrate nachzuweisen, während teichonsäurefreie Zellwände in der Regel Werte von 1 $\mu\text{M}/\text{mg}$ ZW und mehr aufwiesen.

2.3 Zellwandteichonsäuren

Bei der qualitativen papierchromatographischen Untersuchung der Zellwände auf die typischen Komponenten der Teichonsäure Glycerin und Ribit ergaben sich drei Gruppen. Etwa die Hälfte

Tabelle 8:

Zusammenstellung von quantitativen und qualitativen Angaben für verschiedene Zellwandkomponenten in tryptisch gereinigten Zellwänden.

Gruppe	Stamm	Peptidoglycan		Zellwandzucker			Teichonsäuren		
		DD-Carb-oxypeptidase	Mol Ala/ Mol Glu	Gluc (μ M/mg Zellw.)	Gal	Rham	Glyc	Ribit	Phosphat (%/ZW-Trock.G.)
I	DSM 20077	-	2,12	0,70	0,08	0,00	-	-	1,20
	D 3	-	2,30	0,98	0,40	0,00	-	-	1,40
	D 4	-	2,20	0,98	0,40	0,00	-	-	1,40
	Omniflora	-	2,23	1,50	0,55	0,00	-	-	4,90
	F 164	-	2,12	0,96	0,10	0,00	-	-	1,99
	Sc	-	2,06	0,96	0,10	0,00	-	-	0,96
	69 K	-	2,29	0,96	0,43	0,00	-	-	3,36
	SA 24	-	2,13	0,80	0,00	0,00	-	-	1,02
	34-26	-	2,16	0,99	0,26	0,38	-	-	1,74
	CHN-J-1-6	-	2,17	0,20	0,23	0,00	-	-	2,17
	CHN-22-1-10	-	1,94	0,19	0,23	0,00	-	-	3,12
	I-69-7	-	2,12	0,40	0,00	0,00	-	-	0,84
	CHN-I-2-7	-	2,12	1,60	0,30	0,00	-	-	3,36
	PNR-I-2-4	-	2,04	0,70	0,10	0,00	-	-	2,28
	I-36-I	-	2,28	1,51	0,00	0,00	-	-	1,50
	AM 63	-	2,32	0,97	0,20	0,20	-	-	1,20
	F 177 a	-	2,20	0,97	0,00	0,00	-	-	1,62
	H 18 b	-	2,24	1,10	0,08	0,10	-	-	1,86
	F 169 a	-	1,99	0,69	0,22	0,00	-	-	2,50
	VII JS	-	2,10	0,41	0,63	0,00	-	-	1,32
	XXV JR	-	2,26	1,20	0,00	0,00	-	-	0,66
	538	-	2,04	1,04	0,89	0,00	-	-	2,88
II _a	Sp 34	+	1,58	0,16	0,22	0,00	+	-	5,50
	R I	+	1,42	0,37	0,10	0,10	+	-	6,96
	CHN-I-4	+	1,46	0,10	0,10	0,02	+	-	7,92
	A 263-19	+	1,47	0,42	0,15	0,00	+	-	3,72
	T 91	+	1,61	0,32	0,32	0,00	+	-	6,18
	B 39/4b	+	1,47	0,16	0,19	0,00	+	-	8,50
	DSM 20079	+	1,54	0,05	0,02	0,00	+	-	15,50
	ATCC 9857	+	1,71	0,05	0,01	0,00	+	-	13,30
	A 244-1	+	1,47	0,12	0,11	0,00	+	-	9,36
	H 27a	+	1,60	0,07	0,08	0,01	+	-	8,80
	PN-I-9	+	1,55	0,12	0,07	0,02	+	-	4,80
	PNR-I-2-3	+	1,55	0,13	0,05	0,02	+	-	6,36
	CHN-4-2-5	+	1,54	0,04	0,00	0,00	+	-	9,12
II _b	SA 12	+	1,72	0,05	0,00	0,00	-	+	10,56
	SA 13	+	1,70	0,07	0,02	0,00	-	+	13,80
	ATCC 314	+	1,68	0,07	0,07	0,00	-	+	10,40
	SA 9	+	1,60	0,05	0,02	0,00	-	+	13,56
	SA 16	+	1,84	0,07	0,00	0,00	-	+	9,12
	XXIX J	+	1,58	0,15	0,06	0,01	-	+	9,90
	A 201-7	+	1,55	0,15	0,09	0,02	-	+	8,04
	T 50	+	1,52	0,03	0,00	0,00	-	+	6,72
	Kd 16-3	+	1,42	0,57	0,12	0,19	-	+	4,92

aller von uns untersuchten Stämme besaß keine Teichonsäure, die andere Hälfte besaß zu 60 % Glycerin und zu 40 % Ribit. Außerdem wurde bei allen Stämmen noch die Gesamtposphatmenge bestimmt und in der Regel bei allen Vertretern mit Teichonsäure mindestens 4 % des Trockengewichts an Phosphat gefunden. Bei teichonsäurefreien Zellwänden lag der Phosphatgehalt in der Größenordnung von 1 %, wie es der Bindung des Polysaccharids über Phosphodiester an das Glycan entspricht. In einigen Fällen wurden Werte von deutlich mehr als 1 bis 4,9 % gefunden, die sich bei Wiederholen der Analyse bestätigten. Es müssen also noch andere phosphathaltige Komponenten in der Zellwand enthalten sein, wobei es sich z.B. um eine atypische Teichonsäure handeln könnte, was aber nicht weiter untersucht wurde.

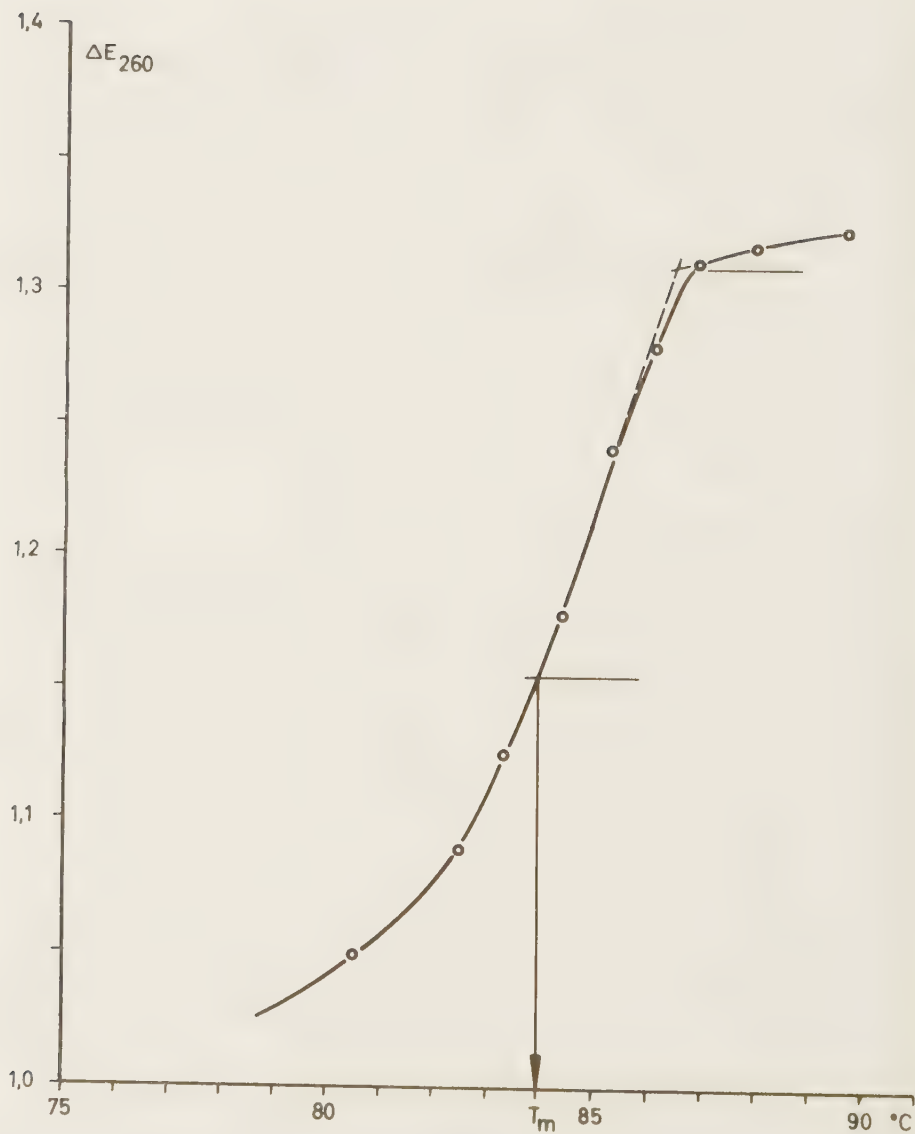
3. G+C-Basengehalt der DNS

Nachdem *L.acidophilus* auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen in phänotypisch sehr verschiedene Gruppen unterteilt werden konnte, war es vorstellbar, daß auch der G+C-Basengehalt der DNS in dieser Art variierte.

Die Temperatur, bei der die DNS eines Organismus denaturiert, steht in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der G-C-Bindungen in der DNS-Helix. Je höher die Denaturierungs- bzw. Schmelztemperatur T_m liegt, desto höher ist auch der Prozentsatz an G- und C-Basen.

Als Schmelzpunkt T_m wurde jeweils die Temperatur ermittelt, bei der die Hälfte der maximalen relativen Extinktion erreicht war. Bei den am Ende nicht waagrecht verlaufenden Kurven wurde die maximale Extinktion als der Schnittpunkt zweier Tangenten an die Kurve definiert.

Wie die Abbildung 9 zeigt, lag die Schmelztemperatur T_m bei den untersuchten Stämmen im Mittel bei 83°C. In Tabelle 9 sind die G+C-Basengehalte einiger Vertreter von *L.acidophilus* zusammengefaßt. Die Werte (33,9 - 35,7 %) lagen alle sehr nahe



$T_m = 84^\circ\text{C}$, das entspricht einem G+C-Basengehalt von 35,9 %.

Abb. 9:

Schmelzkurve der DNS von *L.acidophilus* DSM 20077.

Tabelle 9:

Guanin+Cytosin-Gehalt der DNA

Bezeichnung	GC (%)	DD-Carboxy-peptidase	Teichon-säure	D-LDH	L-LDH
DSM 20077	35,4	-	-	1	I
D 3	35,4	-	-	1	I
F 164	33,8	-	-	1	I
AM 63	33,9	-	-	3	I
F 177a	35,3	-	-	3	I
XXV JR	33,0	-	-	3	I
DSM 20242	35,7	+	+	2	III

beieinander und entsprechen den von Gasser und Mandel (1968) gefundenen Ergebnissen, die Werte von 34,2 bis 36,8 angeben, während von Hill (1966) Werte zwischen 39 und 42 % gefunden wurden. Der Vergleich mit den in der Tabelle 9 rechts dargestellten Merkmalen zeigt deutlich, daß die G+C-Gehalte nicht mit Merkmalen wie Zellwandzusammensetzung oder LDH-Muster korrelieren.

4. DNS-Homologie

4.1 Methodische Vorversuche

4.1.1 DNS-Isolierung

Marmur (1961) gibt an, daß *L.acidophilus* wie viele andere Gram-positiven Bakterien gegen Lysozym und Detergentien resistent sind, während De Ley (1971) eine solche Resistenz zumindest für Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verneint. Weder das von Marmur beschriebene Verhalten noch die von De Ley gemachte Einschränkung konnten von uns bestätigt

werden. Vielmehr lysierten alle vier untersuchten Stämme von *L.acidophilus* unter den im Kapitel Material und Methoden angegebenen Bedingungen gut.

Bei der Präparation der nicht markierten DNS wurde wegen der besseren Bindungsmöglichkeit am Filter und der damit zusammenhängenden besseren Hybridisierungsbedingungen Wert auf möglichst langsträngige DNS gelegt. Dazu wurde DNS aus Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen isoliert, wobei sich zeigte, daß aus Zellen der logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte 0,8) die längste DNS isoliert werden konnte. Die aus dieser Phase isolierten DNS-Stränge konnten, im Gegensatz zu den aus stationären Zellen, auf einen dünnen Glasstab aufgewickelt werden.

4.1.2 Bindung der nicht markierten DNS am Membranfilter

4.1.2.1 Einfluß der Filterporengröße

Die alkalisch denaturierte DNS wurde abgekühlt und bei einer Temperatur von 4°C durch die mit 3 SSC vorgeweichten Filter gesaugt. Dabei wurden Membranfilter mit der Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm miteinander verglichen. Bei der Porengröße von 0,2 µm ergab sich eine etwa um 30 % höhere Bindung der DNS an die Filter. Die Gesamtbindung bei der kleineren Porengröße lag nach zweimaligem Durchsaugen durch die Membranfilter bei 75 bis 90 % der eingesetzten DNS-Menge.

4.1.2.2 Einfluß der Salzkonzentration

Da über die Salzkonzentration der Lösung während des Beladens der Filter unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden waren, wurde der Einfluß verschiedener Salzkonzentrationen auf die Bindung der DNA an die Filter untersucht. Beim Vorwaschen, Beladen und Nachwaschen mit einmal 3 und einmal 6 SSC ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in der Menge filtergebundener DNS.

4.1.3 Markierung von DNS mit ^3H -Thymidin und ^3H -Adenin

Während bei früheren Untersuchungen die DNS meistens mit ^{32}P oder ^{14}C markiert wurde, wählte man für die Membranfilter-Methode eine Markierung der DNS mit ^3H . Diese Markierung wurde durch Zugabe von ^3H -Thymidin in das Medium während des Wachstums erreicht.

Sawula und Zamenhof (1974) berichten, daß bei *L.acidophilus* durch Zugabe von ^3H -markiertem Thymidin ein thymidinabbauendes Enzym induziert wird (Abbau von Thymidin zu Thymin) und deshalb ein geringer Anteil des zugegebenen ^3H -Thymidins in die Bakterien-DNS eingebaut wird.

Dennoch wurde aber, wie Abb. 10 zeigt, sowohl genügend ^3H -Thymidin wie auch ^3H -Adenin von *L.acidophilus* DSM 20242 und DSM 20077 aufgenommen. Beide Stämme zeigten für Thymidin etwa die gleiche Aufnahme von 50 %, während Adenin von *L.acidophilus* DSM 20242 zu einem noch höheren Prozentsatz aufgenommen wurde (77 %).

Diese Zahlen zeigen außerdem, daß die im Medium vorhandenen Nucleotide zu keiner wesentlichen Verdünnung führen. Da Thymidin spezifisch in die DNS eingebaut wird, wurde für die weiteren Versuche ^3H -Thymidin zur Markierung der DNS verwendet.

Die Zunahme der Markierung im Medium am zweiten Tag (Abb.10) ist vermutlich durch eine beginnende Lyse der Bakterien bedingt.

4.1.4 Hybridisierung

Nachdem die wichtigsten Bedingungen für die Bindung der DNS an die Filter untersucht worden waren, galt es nun auch für die Hybridisierung optimale Bedingungen zu finden. Während Gillespie und Spiegelman (1965) die Membranfilter-Technik mit DNS und komplementärer RNS durchführten, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen DNS und komplementäre DNS hybridisiert.

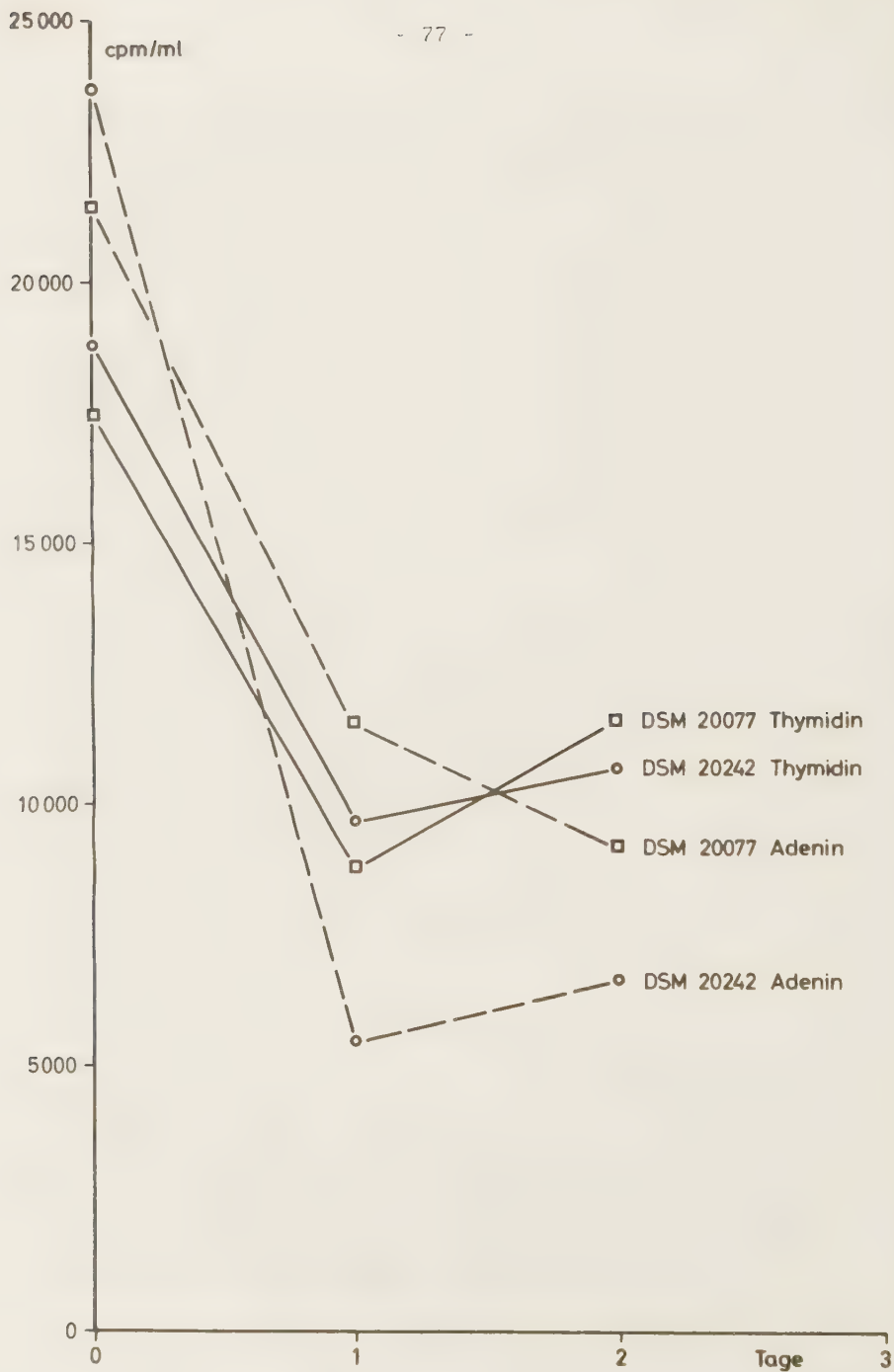


Abb. 10: ^3H -Thymidin- und ^3H -Adenin-Aufnahme in MRS-Medium von *L. acidophilus* DSM 20077 und DSM 20242.

4.1.4.1 Bindungsspezifität

Denhardt (1966), der die Membranfilter-Technik weiterentwickelte, fand, daß unspezifische Bindungen denaturierter DNS durch eine Vorinkubation der Filter in Albumin-Lösung (Denhardt-Lösung) verhindert werden konnte. Die erwünschten spezifischen Bindungen dagegen wurden durch diese Maßnahme nicht gehemmt. Die Inkubation mit Denhardt-Lösung wurde zunächst unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß weder die Salzkonzentration in der Inkubationslösung (3 bzw. 6 SSC) noch die Inkubationszeit einen Einfluß auf die am Filter gebundene Menge an DNS hatten. Auch das Waschen der Filter nach der Inkubation hatte keinen nachweisbaren Verlust an gebundener DNS zur Folge.

4.1.4.2 Hybridisierungstemperatur

Die Temperatur für eine optimale Reassoziationsreaktion zwischen am Filter gebundener und markierter DNS liegt nach Angaben von Marmur und Doty (1961) und Marmur et al. (1963) 25° bis 30°C unter der Temperatur, bei der DNS denaturiert bzw. schmilzt. Diese Denaturierungstemperatur- bzw. Schmelztemperatur (T_m) wird unter anderem durch den G+C-Gehalt der DNS bestimmt (Marmur und Doty 1962). Außerdem spielen die Reaktionsbedingungen wie z.B. die Salzkonzentration für den Schmelzpunkt T_m eine Rolle.

Auch wenn somit die Hybridisierungstemperatur immer unter dem jeweiligen Schmelzpunkt der DNS lag, so war sie dennoch so hoch, daß es bei den relativ langen Hybridisierungszeiten zu Kettenbrüchen und Verunreinigungen im Hybridisierungsansatz kam.

Um dies zu verhindern, wurde dem Hybridisierungsansatz eine wässrige Formamid-Lösung zugegeben. Nach Conaughy (1969)

wird durch Zugabe von 1 % Formamid der T_m um $0,72^\circ\text{C}$ erniedrigt. So konnte bei *L.acidophilus* durch Zugabe von 30 % Formamid zum Hybridisierungsansatz eine Hybridisierungstemperatur von $36,4^\circ\text{C}$ erreicht werden, was zur Folge hatte, daß im Gegensatz zur Hybridisierung bei hohen Temperaturen (z.B. 53°C bei *L.acidophilus*) eine erhöhte Bindung der DNS an die Membranfilter zu verzeichnen war. Ebenso war die Gefahr der Kettenbrüche der DNS während der langen Inkubationszeit geringer.

Die Gefahr einer Infektion bei der erniedrigten Inkubationstemperatur von etwa 36°C war wegen der Anwesenheit der Formamid-Lösung nicht gegeben.

Die DNS-Bindungsrate bei *L.acidophilus* DSM 20077 bei verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen ist in Tabelle 10 zusammengefaßt. Daraus ergibt sich eine maximale Salzkonzentration für eine Formamid-Konzentration von 30 % und damit eine Hybridisierungstemperatur von $36,4^\circ\text{C}$ für diese Art. Auch Bonner et al. (1967) stellte fest, daß die Salzkonzentration auf die Hybridisierungsbedingungen keinen Einfluß hatte. Für die weiteren Versuche wurde eine Salzkonzentration von 3 SSC gewählt.

Tabelle 10:

Bindung der DNS an Membranfilter bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Probe	Inkubationsbedingungen	eingesetzte DNS cpm/ml	gebundene DNS	
			cpm/ml	%
DSM 20077	3SSC, $36,4^\circ\text{C}$, 30% Formamid	6452	2340	36
"	6SSC, $36,4^\circ\text{C}$, 30% Formamid	"	2466	38
"	3SSC, 58°C	"	1696	26
"	6SSC, 58°C	"	1620	25

4.1.4.3 Hybridisierungszeit

Nach Britten und Kohne (1966) beeinflusst die Konzentration an markierter wie auch an gebundener DNS auf dem Filter die Zeit der Inkubation. Beide Konzentrationen müssen optimal gewählt werden, um reproduzierbare Ergebnisse der Reassoziations zu erhalten und somit eindeutige Aussagen über die Verwandtschaft verschiedener Stämme machen zu können. Abb. 11 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung

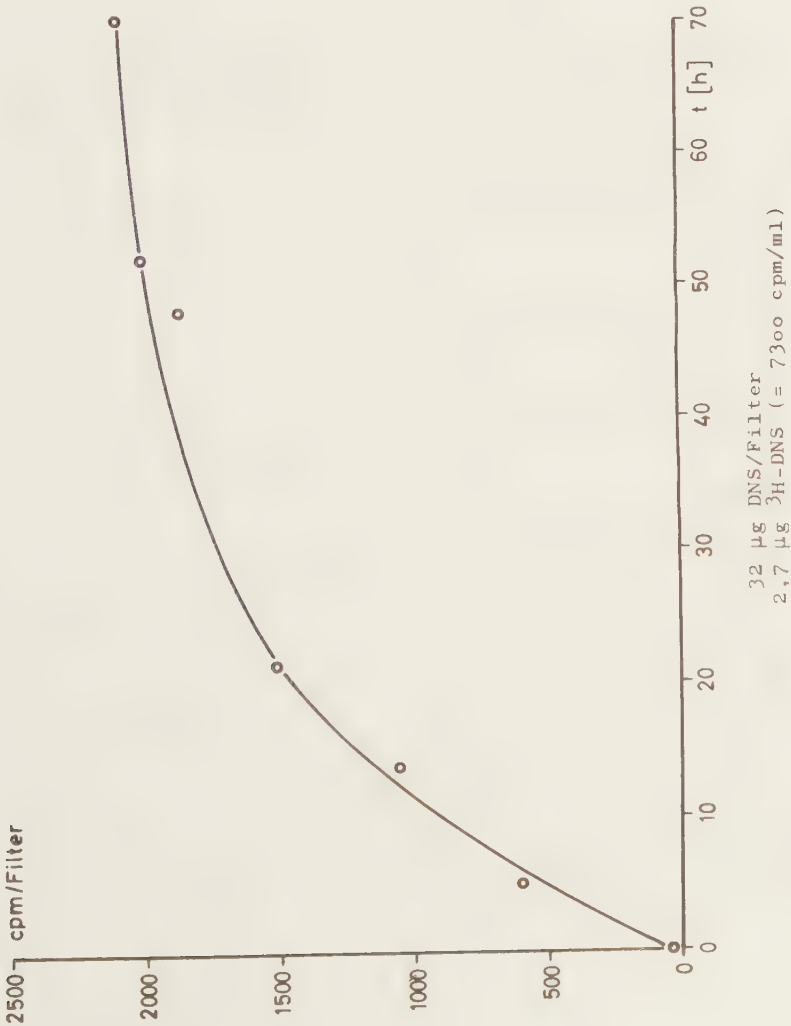
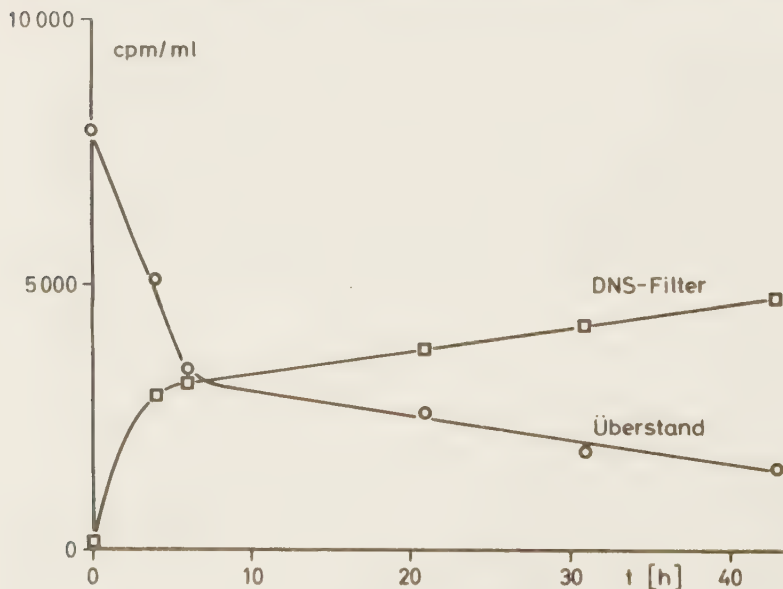


Abb. 11:

^3H -DNS-Bindungsrate an die Filter bei *L.acidophilus* DSM 20077.

von ^3H -Thymidin-DNS von DSM 20077 an mit homologer DNS beladene Filter. Die Beladung betrug $32\text{ }\mu\text{g}$ unmarkierter DNS, und zu jedem Filter wurden $2,7\text{ }\mu\text{g}$ markierte DNS desselben Stammes zugegeben. Nach verschiedenen Intervallen wurde die Inkubationslösung vom Filter abgegossen und der Filter nach dreistündigem Trocknen bei 80°C im Scintillationszähler gemessen. Die Bindungsrate steigt in den ersten Stunden an und erreicht nach etwa 20 Stunden den Sättigungsbereich.

Entsprechend der c_0t -Regel ist nach Kohne (1966) die Bindungsrate bei stärker beladenen Filtern sehr viel höher. Abb. 12 zeigt, daß dementsprechend für *L.acidophilus*



140 μg DNS/Filter
3,3 μg ^3H -DNS (7950 cpm/ml)

Abb. 12:

^3H -DNS-Bindungsrate an die Filter bei *L.acidophilus*
AM 63 Gasser.

AM 63 bei einer Beladung der Filter mit 140 μg DNS der Sättigungsbereich bereits nach 5 bis 6 Stunden erreicht war.

Für die von uns durchgeführten Hybridisierungsversuche, bei denen die Filter mit 23 bis 40 μg beladen waren, wurde eine Inkubationszeit von 22 Stunden gewählt. Nach dieser Zeit konnte sicher mit einer Sättigung der Bindung gerechnet werden.

4.2 DNS-Homologie bei L.acidophilus.

Nach den bisher beschriebenen Vorversuchen wurde die Methode der DNS-Homologie mit vier verschiedenen Vertretern von L.acidophilus durchgeführt. Zur Kontrolle der Methode wurde ein Vertreter der Gattung Cellulomonas mit L.acidophilus AM 63 Gasser hybridisiert. Die Homologie war erwartungsgemäß außerordentlich gering, nämlich 1,4 %.

Die unmarkierte DNS eines jeden der vier Stämme wurde mit der markierten DNS aller Stämme hybridisiert und der Grad der Hybridisierung über die Bindung von Radioaktivität am Filter gemessen. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit und zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurde jeder Versuch in 4 Parallelansätzen durchgeführt.

Tabellell zeigt die Bindung am Filter für alle Kombinationen sowie den als Mittelwert gebildeten Homologiegrad. Dabei wurde der Anteil an gebundener DNS beim homologen Stamm gleich 100 % gesetzt. Diese Bindung homologer DNS betrug bei allen Hybridisierungsversuchen zwischen 38 und 42 %.

Um unspezifische Bindungen der markierten DNS an unbeladene Filter zu erkennen, wurden jeweils zwei (unbeladene) Leerfilter nach der gleichen Vorbehandlung wie die beladenen Filter mit der markierten DNS der jeweiligen Präparation inkubiert. Die hierbei gebundene Menge an radioaktiv markierter DNS war außerordentlich gering (ca. 20 bis 30 cpm/Filter) und entsprach damit dem background.

Tabelle 11:
DNS-DNS-Bindung und % Homologie bei L.acidophilus.

An Filter geb. DNS	Stamm	markierte DNS cpm/ml	Bindung am Filter cpm/Filter	%	Homologie %
9857	20077	2292	200	9	24
9857	9857	3026	1157	38	100
9857	AM 63	2254	195	9	24
9857	A 201-7	6645	906	14	37
A 201-7	20077	2292	199	9	23
A 201-7	9857	3026	498	16	40
A 201-7	AM 63	2254	186	8	20
A 201-7	A 201-7	6645	2648	40	100
20077	20077	2056	874	42	100
20077	9857	2677	298	11	26
20077	AM 63	2119	688	32	76
20077	A 201-7	6664	602	9	21
AM 63	20077	2056	652	32	76
AM 63	9857	2677	312	12	29
AM 63	AM 63	2119	882	42	100
AM 63	A 201-7	6664	608	9	21

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, daß die Homologie zwischen zwei verschiedenen Stämmen von *L.acidophilus* praktisch unabhängig von der jeweiligen DNS-Kombination war. Es war also gleichgültig, ob die am Filter gebundene DNS eines Stammes A mit der markierten DNS eines Stammes B hybridisiert wurde oder umgekehrt.

Tabelle 12 zeigt noch einmal die Homologie der 4 Stämme untereinander, wobei die Ergebnisse aus den Hybridisierungsversuchen anderen Merkmalen der betreffenden Stämme gegenübergestellt werden.

Zunächst lassen sich zwei Gruppen bilden:

Die eine Gruppe (*L.acidophilus* DSM 20077 und AM 63 Gasser) besitzt keine Carboxypeptidase und weist daher im Peptidoglycan einen Rest von Pentapeptiduntereinheiten auf. Dieses Merkmal korreliert mit dem Fehlen von zellwandgebundener Teichonsäure.

Die Vertreter der zweiten Gruppe besitzen Carboxypeptidase und damit nur Tetra- und Tripeptide als Peptiduntereinheit des Mureins. Sie weisen außerdem zellwandgebundene Teichonsäuren auf. *L.acidophilus* DSM 20242 und 13 weitere Stämme besitzen eine Teichonsäure vom Glycerin-Typ, A 201-7 und 9 weitere Stämme eine solche vom Ribit-Typ.

Die beiden Stämme der ersten Gruppe zeigten in Übereinstimmung mit den genannten Eigenschaften untereinander eine relativ hohe Homologie von 76 %, aber eine geringe Homologie gegenüber den beiden anderen Stämmen der zweiten Gruppe (20-29 %).

Die Stämme der zweiten Gruppe weisen dagegen untereinander nur einen relativ geringen Homologiegrad von 37-40 % auf, der aber immer noch deutlich über dem gegenüber den beiden Stämmen der ersten Gruppe (21-29 %) liegt.

Tabelle 12:

Hybridisierung mit *L. acidophilus*.

Hybridisierungsansatz: 1 ml 3SSC, 30 % Formamid, 36°C, 21 h.

Menge der DNS auf dem Filtersegment etwa 23-40 µ nach Burton.

Eingesetzte markierte DNS ~ 1 µg.

Gruppe	DNS*	20077	AM63	9857	A201-7	Elektrophorese		Zellwand DD-Carboxy- pentidase	Teichon- säure		Zucker		Zellwandzucker		
						D-LDH	L-LDH		Glyc.	Ribit	Salt	Meli	Glu	Gal	Rham
I	DSM 20077	100 %	76 %	26 %	21 %	1	I	-	-	-	-	-	+	+	-
I	AM63 Gasser	76 %	100 %	29 %	21 %	3	I	-	-	-	+	-	+	+	+
II	ATCC 9857	24 %	24 %	100 %	37 %	2	III	+	+	-	-	+	+	-	-
II	A201-7 Mits.	23 %	20 %	40 %	100 %	3	II	+	-	+	+	+	+	+	+

IV. Schlußbetrachtung

Die Untersuchungen von 44 Stämmen von *L.acidophilus* hat die einleitend erwähnte große Variationsbreite hinsichtlich der Merkmalskombinationen in vollem Umfang bestätigt und die Überprüfung neuerer biochemischer Merkmale hat gezeigt, daß auch hier Variationen auftreten, die in einigen Fällen so gut korreliert sind, daß sie sich zur Aufstellung von Untergruppen eignen.

Die Untersuchungen des Peptidoglycans ergaben, daß bei rund der Hälfte der Stämme Pentapeptide erhalten bleiben, also vermutlich keine Carboxypeptidase vorliegt, während bei der anderen Hälfte von den nicht quervernetzten Peptid-untereinheiten das D-Alanin durch Carboxypeptidase abgespalten wird, so daß Tripeptide entstehen und der Gehalt an Alanin/Mol Glutaminsäure deutlich unter 2,0 absinkt.

Das Vorkommen zellwandgebundener Teichonsäure korreliert bei *L.acidophilus* mit dem Auftreten von Carboxypeptidase, wobei innerhalb dieser Gruppe von Stämmen noch zwischen glycerinhaltiger und ribithaltiger Teichonsäure unterschieden werden muß.

Obwohl die Zusammensetzung zellwandgebundener Zucker keine Korrelation mit den bis jetzt erwähnten Merkmalen ergab, so konnte doch festgestellt werden, daß die Stämme, deren Zellwände Teichonsäure enthielten, generell weniger Kohlehydrate aufwiesen als die andere Gruppe.

Die Vielfalt der LDH innerhalb der Art *L.acidophilus* wurde bereits von Gasser beschrieben und auch von uns durch Untersuchungen an einigen Vertretern bestätigt. Bei den von uns untersuchten Stämmen fanden wir sowohl für die L-LDH als auch für die D-LDH drei verschiedene isofunktionelle Enzyme, wobei, wie auch von Gasser beschrieben, mit einer Form der L-LDH 2 oder 3 verschiedene Formen der D-LDH kombiniert waren. Die Tatsache, daß bei Gasser eine strikte Korrelation

zwischen den L-LDH und den D-LDH-Typen bestand, ist wahrscheinlich auf die zu geringe von ihm untersuchte Zahl an Stämmen zurückzuführen.

Die neben den NAD-abhängigen vier unterschiedlichen NAD-unabhängigen LDH-Formen zeigten bei der L-LDH eine sehr gute Parallelität, wobei mit zwei der NAD-abhängigen Formen der L-LDH immer jeweils eine Form der NAD-unabhängigen L-LDH kombiniert war, während bei Anwesenheit der 3. Form der NAD-abhängigen L-LDH die NAD-unabhängige L-LDH fehlte. Bei der NAD-unabhängigen D-LDH ergab sich nur eine beschränkte Parallelität zu den entsprechenden NAD-abhängigen D-LDH-Formen.

Wie die Tabelle 13 zeigt, konnte auch eine Korrelation zwischen den L-LDH-Formen und den schon erwähnten Merkmalen gefunden werden. Vertreter von *L.acidophilus*, die keine Carboxypeptidase aufwiesen und auch keine Teichonsäure in ihrer Zellwand enthalten hatten, besaßen nur eine L-LDH vom Typ I, während die andere Gruppe alle drei möglichen L-LDH-Typen aufwiesen.

Die Untersuchungen der DNA-Homologie der drei verschiedenen Gruppen bestätigten die durch die bis jetzt erwähnte Merkmale gewonnenen Unterschiede. Die Vertreter der beiden Gruppen, die sich durch das Vorkommen oder Fehlen der Carboxypeptidase unterschieden, wiesen untereinander nur Werte von 21-29 % auf. Innerhalb der Gruppe I lag der Homologiegrad mit 76 % dagegen sehr hoch. Die beiden Stämme der Gruppe II, die unterschiedliche Teichonsäure aufwiesen, zeigten ebenfalls einen relativ geringen Wert von nur 37-40 %, der allerdings höher als der zwischen den beiden Gruppen I und II lag, was auf eine engere Verwandtschaft innerhalb der Gruppe II schließen läßt.

Tabelle 13:

Übersicht über einige Merkmale.

Gruppe	Stamm	DD- Carb.	Teichons.		Zellw. Zucker			LDH		Mann	Raff	Meli	Sac	Mal	Treh	Lac	Cello	Sali	Inul.
			Glyc	Rib.	Glu	Gal	Rham	L-LDH	D-LDH										
I	DSM 20077	-	-	-	+	+	+	I	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	7 St.																		
	3 St.				+	+	+ ²	I	2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	11 St.				+	+	- ⁸	I	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II _A	ATCC 9857	+	+	-	+	+	-	III	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 St.				+	+	+ ³	II	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5 St.				+	+	-	III	1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	1 St.				+	+	+	I	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1 St.				+	+	+ ³	II	3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	4 St.				+	+				-	+	+	+	+					
II _B	A 201-7	+	-	+	+	+	+ ³	II	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	4 St.				+	+	-	II	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	2 St.				+	+	-	III	1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	1 St.				+	+	-	III	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2 St.				+	+		III		-	+	+	+	+					

Die Ergebnisse der DNS-Homologie, sowie die oben erwähnte gute Korrelation der anderen Merkmale, sprechen dafür, daß die Art *L.acidophilus* in 2 Arten aufgetrennt werden muß, wobei die eine Art durch das Fehlen von Carboxypeptidase und zellwandgebundener Teichonsäure wie das Vorkommen von L-LDH von Typ I charakterisiert ist, die andere Art aber Carboxypeptidase und Teichonsäure vom Glycerin- oder Ribit-Typ aufweist. Diese zweite Art kann dann noch entsprechend dem Teichonsäuretyp in Unterarten aufgegliedert werden.

Ein endgültiger Vorschlag für die neuen Taxa soll erst dann gemacht werden, wenn die Homologie einer gewissen Zahl von Stämmen der jeweiligen Taxa untersucht worden ist, damit nicht voreilige Schlüsse gezogen werden und dadurch neue Verwirrung geschaffen wird.

V. Zusammenfassung

44 Stämme der Art *L.acidophilus* verschiedener Herkunft wurden hinsichtlich ihrer klassischen und neueren biochemischen Merkmale untersucht. Bei einigen phänotypisch sehr verschiedenen Stämmen wurde auch der DNS-Homologiegrad bestimmt.

Das Isomerenverhältnis der gebildeten Milchsäure veränderte sich während des Wachstums bei fast allen Stämmen. Abgesehen von wenigen Fällen, in denen von Anfang an Racemat gebildet wurde, entstand zunächst überwiegend bis ausschließlich L-Milchsäure. Die Bildung des D-Isomeren setzte erst später ein. Bis zum Ende des Wachstums hatte die Menge an D-Isomeren die an L-Isomeren in unterschiedlichem Maße eingeholt oder in einigen Fällen auch erheblich übertroffen. Dieses unterschiedliche Verhalten ist stammspezifisch, ließ sich aber nicht mit einem der anderen Merkmalskomplexe korrelieren und ist daher nur zur Charakterisierung des Stammes, aber nicht allgemein taxonomisch verwertbar.

Milchsäureracemase konnte nicht nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Bildung der beiden Isomeren beruht vielmehr auf dem Vorhandensein beider stereospezifischer Milchsäuredehydrogenasen, die im Verlauf des Wachstums in unterschiedlichen Mengen gebildet werden. Eine Induktion der D-Milchsäuredehydrogenase durch L-Milchsäure ließ sich nicht erreichen.

Merkmale wie die Verwertung bestimmter Zucker und der G+C-Anteil in der DNS (33,9 - 35,7 %) lieferten keine Grundlage zur Unterteilung der Art.

Aufgrund der Peptidoglycanstruktur konnten die Stämme in zwei etwa gleichgroße Gruppen eingeteilt werden, wobei das Peptidoglycan der einen Gruppe Pentapeptide und das der

anderen nur Tri- und Tetrapeptide aufwies. Dieser Unterschied zeigt an, daß die 1. Gruppe im Gegensatz zur 2. keine Carboxypeptidaseaktivität besitzt. Mit dem Vorkommen der Carboxypeptidase war immer das Vorkommen zellwandgebundener Teichonsäure vom Glycerin- oder Ribit-Typ kombiniert. Die Vertreter dieser Gruppe wiesen in der Regel auch einen geringeren Gehalt an zellwandgebundenen Zuckern auf.

Die Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität der NAD-abhängigen LDH ergab jeweils 3 verschiedene Formen der D- und L-LDH, wobei die mit einer Form der L-LDH kombinierte D-LDH 2 oder 3 verschiedenen Formen angehören konnte. Eine gute Korrelation der NAD-abhängigen L-LDH ergab sich zur NAD-unabhängigen L-LDH, von der ebenfalls 2 elektrophoretisch verschiedene Formen gefunden wurden. Zwei der NAD-abhängigen Formen der L-LDH waren immer mit jeweils einer Form der NAD-unabhängigen Form kombiniert, während bei Anwesenheit der 3. Form der NAD-abhängigen L-LDH sowohl die NAD-unabhängige L- als auch D-LDH fehlten. Bei der NAD-unabhängigen D-LDH ergaben sich 4 elektrophoretisch verschiedene Formen, die aber relativ selten - nur bei etwa einem Drittel der Stämme - auftraten, und, soweit sie vorkamen, eine gewisse, wenn auch beschränkte Parallelität zum Vorkommen der übrigen LDH-Formen aufwiesen.

Eine Parallelität ohne Ausnahme ergab sich zwischen dem Vorkommen der Form I der NAD-abhängigen L-LDH und dem Fehlen der Carboxypeptidase. Die beiden anderen Formen der L-LDH verteilten sich auf die Gruppe mit Carboxypeptidaseaktivität und Teichonsäure, ohne daß sich eine Parallelität der beiden L-LDH-Formen mit der Art der Teichonsäure ergab.

Die aufgrund der Zellwandmerkmale und der LDH-Formen vorgenommene Aufteilung der Stämme in zwei Gruppen wird auch durch die Untersuchung der DNS-Homologie bei 4 typi-

schen Stämmen bestätigt. Die beiden Stämme der Gruppe I ohne Carboxypeptidaseaktivität und ohne Teichonsäure wiesen untereinander den sehr hohen Homologiegrad von 76 % auf. Dagegen zeigten die beiden Vertreter der Gruppe II, die durch das Vorkommen von Carboxypeptidase und zellwandgebundener Teichonsäure vom Glycerin- oder Ribit-Typ charakterisiert sind, gegenüber den beiden Stämmen der Gruppe I nur einen sehr niedrigen Homologiegrad von rund 20 bzw. 29 %. Auch untereinander war bei den beiden Stämmen der Gruppe II von denen der eine Glycerinder andere Ribit-Teichonsäure enthielt, nur sehr gering, nämlich rund 40 %. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die bisherige Art *L.acidophilus* entsprechend den beiden Gruppen mindestens in zwei Arten aufgeteilt werden muß, wobei sich für die Stämme der 2. Gruppe eine weitere Aufgliederung in 2 Unterarten, wenn nicht in 2 weitere Arten, anbietet. Da bisher die DNS-Homologie nur bei 4 Stämmen untersucht wurde, wird die Benennung neuer Arten zurückgestellt, bis die Parallelität der phänotypischen Gliederung mit den Ergebnissen der DNS-Homologiestudien an einer größeren Zahl von Stämmen gesichert ist.

VI. Literaturverzeichnis

- Abo-Elnaga, I.G. und Kandler, O. (1965). Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. III. Das Vitaminbedürfnis. Zbl.Bakt.Abt.II. 119, 661.
- Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D., and Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res. 5, 340-345.
- Archibald, A.R. (1973). Teichoic acids. Meth.Carbohydrate Chem. Vol. VI. 162-172.
- Baddiley, J., Buchanan, J.G., Handschumacher, R.E., Prescott, J.F. (1956). Chemical studies in the biosynthesis of purine nucleotides. Part I. The preparation of N-glycylglycosylamines. J.chem.Soc., 2818-2823.
- Baumgärtel, Tr. (1954). Klinische Darmbakteriologie für die ärztliche Praxis, Stuttgart, Georg Thieme.
- Birnstiel, M.L., Sells, B.H., and Purdom, I.F. (1972). Kinetic Complexity of RNA Molecules. J.Mol.Biol. 63, 21-39.
- Bonner, J., Kung, G., and Bekhar, I. (1967). A Method for the Hybridization of Nucleic Acid Molecules at Low Temperature. Biochem. 6, 3650.
- Briggs, M. (1953). The Classification of *Lactobacilli* by means of Physiological Tests. J.gen.Microbiol. 9, 234-248.
- Britten, R.J., and Kohne, D.E. (1966). Nucleotide Sequence repetition in DNA. Carnegie Inst. Washington Year 65, 78-106.
- Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed.8.Williams and Wilkins/Baltimore.
- Burton, K. (1968). Determination of DNA Concentration with Diphenylamine. Methods in Enzymology Vol.XII, Part B,163.
- Chen, P.S., Toribara, T.Y., and Warner, H.(1956). Microdetermination of phosphorus. Analyt.Chem. 28, 1756-1758.
- Conaughy, Mc., B.L., Laird, C.D., and Mc Carthy, B.J.(1969). Nucleic Acid Reassociation in Formamide. Bioch. 8, 3289.

- Coyette, J., and Ghuyssen, J.M. (1970). Structure of the walls of *Lactobacillus acidophilus* strain 63 AM Gasser. *Biochemistry* 9, 2935-2943.
- Cruickshank and Berry, (1924). A study of *B. acidophilus* in human faeces. *Brit. Med. Journ.* 3334, zit. nach Kopeloff.
- Cummins, C.S., and Harris, H. (1958). Studies on the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. gen. Microbiol.* 14, 583-600.
- Curran, H.C., Rogers, L.A. and Whittier, E.O. (1933). The distinguishing characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 25, 595.
- Davis, G.H.G. (1955). The classification of lactobacilli from the human mouth. *J. gen. Microbiol.* 13, 481-493.
- De Ley, J., and Schell, J. (1963). Desoxyribonucleic Acid Base Composition of Acetic Acid Bacteria. *J. gen. Microbiol.* 33, 243-253.
- De Ley, J. (1971). Hybridization of DNA. *Methods in Microbiol.* 5 A, 311.
- Dellaglio, F., Bottazzi, V., and Trovatelli, L.D. (1973). Deoxyribonucleic acid homology and base composition in some thermophilic lactobacilli. *J. gen. Microbiol.* 74, 289-297.
- Dellaglio, F., Bottazzi, V., and Vescovo, M. (1975). Deoxyribonucleic Acid Homology Among *Lactobacillus* Species of the Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25, 160-172.
- Denhardt, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 641-646.
- Doty, P., Boedker, H., Fresco, J.R., Haselkorn, R., Litt, M. (1959). Secondary structure in ribonucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 45, 482.

- Doty, P., Marmur, J., Eigner, J., and Schidkraut, C. (1960). Strand separation and specific recombination in DNA's. II. Physical chemical studies. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 46, 416-476.
- Druckrey, O. (1928). Über Lactobacillus acidophilus und Acidophilus Milch. Zbl.Bakt.II, 74, 373.
- Escherich, Th. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Fortschr.d.Med. Bd.3, Nr. 16, 17.
- Escherich, Th. (1886). Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart.
- Fiedler, F. und Kandler, O. (1964). Die Konstanz der Artmerkmale von L.acidophilus bei Fortzüchtung in Milch. Milchwiss. 19, 465-473.
- Fischer (1919). The use of fermented milk and milk diet to control intestinal purification. Storrs Agr.Exp.Stat.Bull. 104. cit.nach Kopeloff.
- Garvie, E.J. (1967). The production of L(+)- and D(-)-lactic acid in cultures of some lactic acid bacteria, with a special study of Lactobacillus acidophilus NCDO 2.J. Dairy Res. 34, 31-38.
- Gasser, F. and Mandel, M. (1968). Deoxyribonucleic Acid Base Composition of the Genus Lactobacillus. J.Bacteriol.96, 580-588.
- Gasser, F. (1970a). Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the Genus Lactobacillus. J.gen. Microbiol. 62, 223-239.
- Gillespie, P., and Spiegelman, S. (1965). A quantitative Assay for DNA/RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol.12, 829-842.

- Gordon, G.L., and Doelle, H.W. (1975). Production of Racemic Lactic Acid in *Pediococcus cerevisiae* Cultures by Two Lactate Dehydrogenases. J.Bacteriol. 121, 600-607.
- Harrison, A.P., Jr., and Hansen, P.A. (1950a). The bacterial flora of the cecal feces of healthy turkeys. J.Bact. 59, 197-210.
- Henneberg, W. (1926). Über *Bacillus acidophilus* und *Acidophilus*-Milch. Molk.-Ztg. Hildesheim 149.
- Henneberg, W. (1934). Zur Kenntnis der stäbchenförmigen Milchsäurebakterien. Zbl.Bakt., Abt.II, 34, 102.
- Hill, L R. (1966). An Index to Deoxyribonucleic acid Base Compositions of Bacterial Species. J.gen.Microbiol. 44, 413-437.
- Hohorst, H.J. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer) 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.
- Howe and Hatch (1917). Study of the microorganisms of dental caries. The Dental Cosmos 59, 961.
- Ikawa, M. and Snell, E.E. (1960). Cell wall composition of lactic acid bacteria. J.Biol.Chem. 235, 1376-1382.
- Kandler, O. (1967). Taxonomie und technologische Bedeutung der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. Zbl.Bakt.Abt.I. 2, 139-164.
- Kandler, O. (1969). Was wissen wir heute über die Laktobacillenflora des Darmes und deren Bedeutung für den Menschen. Diäta 15, 20-23 und 10-17.
- Kantorowicz (1921). Bakteriologische und histologische Studien über die Karies des Dentins. Dtsch.Zahnheilk. in Vortr. Leipzig (Thieme) H.21.

- Kitahara, K. and Obayashi, A. (1955). DL-forming lactic acid bacteria. J.gen.Microbiol. 1, 237-245.
- Kopeloff (1926). Lactobacillus acidophilus. Baltimore (Williams and Wilkins Co.)
- Kopeloff, L.M. and Kopeloff, N. (1937). Optical activity of lactic acid produced by Lb.acidophilus and L.bulgaricus. J.Bacteriol. 33, 331-334.
- Kulp, W.L. and Rettger, L.F. (1924).Cooperative study of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. J.Bacteriol. 2, 357-394.
- Lerche, M. und Reuter, G. (1962). Das Vorkommen aerob wachsender gram-positiver Stäbchen des Genus Lactobacillus Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. Zbl. Bakt. 185, 466.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.
- Man, J.C. de, Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. J.appl.Bacteriol.23, 130-135.
- Mandel, M. and Marmur, J. (1968). Use of Ultraviolet Absorbance-Temperature profile for Determining the Guanine plus Cytosine Content of DNA. In: S.P. Colwick and N.O. Kaplan (Eds.) Methods in Enzymology Vol. XII, Part B (109), Pg.195-206, Academic Press. Inc. Publishers, New York.
- Marmur, J., and Lane, D. (1960). Strands separation and specific recombination in DNA's. I. Biological studies. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S. 46, 453-461.

- Marmur, J. (1961). A Procedure for the isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. J.Mol. Biol. 3, 208-218 (ed.Vol.VI of Methods in Enzymology, 726-738).
- Marmur, J., and Doty, P. (1961). Thermal renaturation of DNA. J.Mol.Biol. 3, 585-594.
- Marmur, J., and Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J.Mol.Biol. 5, 109-118.
- Marmur, J., Rownd, R., and Schildkraut, C.L. (1963). Denaturation and renaturation of DNA. Progr.Nucleic Acid Res.1, 231-300.
- Maurer, H.R. (1968). Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag Berlin.
- Metschnikoff, E. (1908). Beiträge zu einer optimistischen Welt-auffassung. Lehmann, München.
- Miller, A. III, Sandine, W.E. and Elliker, P.R. (1970). Deoxyribonucleic acid homology in the genus Lacto-bacillus. Can.J.Microbiol. 17, 625-634.
- Mitsuoka, T. (1969). Vergleichende Untersuchungen über die Lakto-bazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern. Zbl.Bakt.I. Orig. 210, 32-51.
- Moro (1900). Über den Bacillus acidophilus. Jahrb.f.Kinderheilk. Bd. 52, 38-55.
- Moro (1905). Morphologische und biologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings. Jahrb.f.Kinderheilk. Bd. 61, 687-734, 870-899.
- Orla-Jensen, S. (1919), The lactic bacteria. Copenhagen, Anhr. Fred. Høst and Søn.

- Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, A.D., and Winther, O. (1936).
Bacterium bifidum und Thermobakterium intestinale. Zbl.
Bakt.Abt. II. 93, 321-343.
- Pederson, C.S. (1947). The relationsship between L.acidophilus
(Moro) Holland and Lactobacillus casei (Orla-Jensen)
Holland. J.Bacteriol. 53, 407-415.
- Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchell, J.A., Disraely, M.N., and
Beaman, J.A. (1953). Species differentiation of oral
lactobacilli. J.Bacteriol. 65, 681.
- Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1959). An approach to the classi-
fication of the lactobacilli. J.appl.Bacteriol.22, 329.
- Rahe, A.H. (1914). An investigation into the fermentative
activities of the aciduric bacteria. Journ.Inf.Dis.15,
141-150.
- Sawula, R.V., Zamenhof, S., and Zamenhof, P.J. (1974).
Degradation of Thymidine by Lactobacillus acidophilus.
J.Bacteriol. 117, 1358-1360.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1967). Zur chemischen Zusammen-
setzung der Zellwand der Streptococcen. I. Die Amino-
säuresequenz des Mureins von Streptococcus thermophilus
und Streptococcus faecalis. Arch.Microbiol.57, 335-364.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan Types
of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications.
Bacteriol.Rev.36, 407-477.
- Schlirf (1926). Zur Kenntnis der azidophilen Bakterien. Zbl.
Bakt. Abt.I. Orig. 97, 104-118.
- Sharpe, M.E. (1955). A serological classification of lactobacilli
J.gen.Microbiol. 12, 107-122.
- Sharpe, M.E. and Mattick, A.T.R. (1957). Milchwiss.12, 348-349.
The identification of Lactobacillus acidophilus.

- Sharpe, M.E. (1962). Taxonomy of the Lactobacilli. Dairy Sci. Abstr. 24, 109.
- Sharpe, E.M., Davison, A.L. and Baddiley, J. (1964). Teichoic Acids and Group Antigens in Lactobacilli. J.gen. Microbiol. 34, 333-340.
- Stetter, K.O. (1973). Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerengemischen bei Lactobacillen. Dissertation, Technische Universität, München.
- Stetter, K.O. und Kandler, O. (1973). Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milchsäure bei Lactobacillen und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobacterium. Arch.Mikrobiol. 94, 221-247.
- Tissier, H. (1899/1900). Étude sur la flore intestinale normale et pathologique chez le nourrisson. Thèse Nr. 269 Paris G.Carre et C.Naud.
- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale normale pathologique du nourrisson. Thèse, Paris, p.85-96.
- Tittsler, R.P., Geib, D.S. and Rogosa, M. (1947). Taxonomy of the Genus Lactobacillus with special reference to corrections of differential characteristics. J.Bacteriol. 54, 12-13.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.D. and Harrison, J.S. (1950). Detection of sugars on paperchromatograms. Nature 166, 444-445.
- Weather, D.M. (1955). The Characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. J.gen. Microbiol. 12, 123-132.

Weaver, R.H. (1932). Fermentation studies on *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J.infect. Dis. 51, 273.

Weiß, N. (1967). Beiträge zur Taxonomie des Genus *Lactobacillus* Beijerinck. Dissertation.

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.O. Kandler von Juni 1972 bis September 1975 angefertigt.

Herrn Prof.Dr.O. Kandler danke ich für das große Interesse an meiner Arbeit, für alle persönlichen Anregungen und wertvollen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr.E. Stackebrandt für viele anregende Diskussionen zur DNS-Homologie danken und Herrn Dr.K.O. Stetter für die stete Anteilnahme an meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch den kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Frau L.Hagner und Frau Ch.Matzenbacher danke ich für ihre Assistenz.

Lebenslauf

Am 22. Oktober 1947 wurde ich, Christine Helming, geb. Fünfer, als Tochter des Physikers Dr.rer.nat. Ewald Fünfer und seiner Frau Anny, geb. Enderlein, in Lörrach geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich in München die Volksschule und anschließend, von 1958 bis 1967, das Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger. Im Juli 1967 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich mit dem Fachstudium in Richtung Mikrobiologie an der Technischen Universität München und legte im Sommersemester 1972 die Diplomprüfung für Biologen ab.

Im Juni 1972 begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.O. Kandler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Von Juni 1972 bis Februar 1973 erhielt ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz. Ab Februar 1973 hatte ich die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft inne.

Seit August 1970 bin ich mit dem Diplom-Ingenieur Gerhard Helming verheiratet.

